

**Regulation der Cbfa1 Expression in  
humanen gesunden und arthrotischen Gelenkchondrozyten  
in vitro**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Nusselt, Thomas  
aus Pirmasens

Gießen 2006

Aus dem Institut für Pathologie  
des Medizinischen Zentrums für Pathologie  
der Justus Liebig Universität Giessen

Direktor: Prof. Dr. A. Schulz

Gutachter: Prof. Dr. A. Schulz

Gutachter: PD Dr. Ch. Heiss

Tag der Disputation:

30. November 2006

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Einleitung zum Thema</b>	<b>4</b>
<b>1.2 Knorpel</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Hyaliner Gelenkknorpel</b>	<b>5</b>
1.3.1 Funktion und Eigenschaften	5
1.3.2 Bestandteile	7
1.3.2.1 Chondrozyten	7
1.3.2.2 Knorpelgrundsubstanz	8
1.3.2.2.1 Proteoglykane	8
1.3.2.2.2 Kollagen	9
1.3.3 Struktureller Aufbau	11
1.3.4 Besonderheiten des Knorpelstoffwechsels	14
<b>1.4 Physiologische Gewebeerterung und Regenerationspotential</b>	<b>15</b>
<b>1.5 Osteoarthrose</b>	<b>16</b>
<b>1.6 Core binding factor (Cbf)</b>	<b>17</b>
1.6.1 Biologische Funktion der $\alpha$ -Untereinheiten	18
1.6.2 Die Rolle des Cbfa1 in der Chondrogenese	19
<b>1.7 Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)</b>	<b>21</b>
<b>2 Fragestellung</b>	<b>22</b>
<b>3 Material und Methodik</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Gewinnung des Knorpelmaterials</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Zellkultur</b>	<b>24</b>
3.2.1 Kulturmedium	24
3.2.2 Zellgewinnung	25
3.2.3 Bestimmung der Zellzahl	26
3.2.3.1 Neubauer Zählkammer	26
3.2.3.2 Elektronische Feinpartikelzählungen	27
3.2.3.3 MTT-Test	27
<b>3.3 Alginat</b>	<b>29</b>
3.3.1 Das Alginsystem	29

3.3.2	Herstellung der Alginatlösung	30
3.3.3	Anlegen der Alginatkultur	30
<b>3.4</b>	<b>Chondrozytenkultivierung</b>	<b>31</b>
3.4.1	Gewinnung der Nativprobe (→Passage0/Tag0 = p0d0)	31
3.4.2	Gewinnung der Verlaufspalten	31
3.4.3	Aufarbeiten der Kultur	31
<b>3.5</b>	<b>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</b>	<b>33</b>
3.5.1	Grundlagen der DNA-Replikation	33
3.5.2	Prinzip der PCR	34
3.5.3	Isolation der totalen RNA aus Chondrozyten	35
3.5.4	Reverse Transkription	36
3.5.5	Qualitative PCR	37
<b>3.6</b>	<b>Quantitative Real-Time-PCR (qrt PCR)</b>	<b>39</b>
3.6.1	Grundlagen	39
3.6.2	Berechnung	41
3.6.3	Reaktionsbedingungen	42
<b>3.7</b>	<b>Elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA</b>	<b>44</b>
3.7.1	Prinzip der Agarose-Gel-Elektrophorese	44
3.7.2	Agarose-Gel-Elektrophorese	44
<b>3.8</b>	<b>Statistik</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
4.1	Wachstumskurven	46
4.2	Ergebnisse der qualitativen PCR	48
4.3	Cbfa1 Expression	48
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>52</b>
5.1	Zellkultur	52
5.2	Degeneration und Regeneration von Chondrozyten	54
5.3	Chondrogene Differenzierung und Dedifferenzierung	59
5.4	Plastizität	60

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>62</b>
6.1	Zusammenfassung (deutsch)	62
6.2	Summary (english)	63
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>76</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>77</b>
9.1	Statistische Daten	77
9.2	Material und Reagenzien	86
9.3	Abkürzungsverzeichnis	89
9.4	Ehrenerklärung	91
9.5	Danksagungen	92
9.6	Lebenslauf	93

## 1 Einleitung

### 1.1 Einleitung zum Thema

In der orthopädischen Chirurgie nimmt der Stellenwert der Behandlung von Knorpeldefekten eine immer größere Rolle ein. Patienten mit Beschwerden werden behandelt um Schmerzen zu lindern, aber auch mit dem Ziel einen Defekt wieder zu beseitigen. Hierzu werden heute verschiedenste Verfahren angewandt, wie zum Beispiel das Shaving, die Mikrofrakturierung, Knorpelstanzzyylinder, die autologe osteochondrale Knorpeltransplantation (OCT) (Werner et al, 2003) oder die autologe Chondrozytentransplantation (ACT).

Bei dem Verfahren der autologen Chondrozytentransplantation besteht das Prinzip in der Vermehrung von dem Patienten entnommenen Chondrozyten in vitro und einer Reimplantation zur Defektdeckung mit dem Ziel der Defektheilung. Als Pioniere auf diesem Gebiet gelten nach wie vor *Peterson und Brittberg*. Es werden in einer „ersten“ Operation Knorpelzellen aus einem defektfreien Gelenkareal des Patienten entnommen. Anschließend werden die Chondrozyten in vitro kultiviert und vermehrt. In einer „zweiten“ Operation wird der Defekt mit einem autologen Periostlappen gedeckt und die in vitro kultivierten Chondrozyten, in Form einer Zellsuspension, unter diesen Lappen gebracht.

Studien zufolge (Peterson, 2003), entsprechen die Optik, als auch die Biomechanik nahezu dem physiologischen hyalinen Knorpelgewebe. Histomorphologisch ähnelt dieser Knorpel allerdings der Struktur eines Faserknorpels, weshalb man immer noch von einer Defektheilung sprechen sollte.

Aufgrund dieser Erkenntnisse versucht man den Chondrozyten eine möglichst natürliche Umgebung zu bieten, indem durch ein Kollagengel (Schneider et al, 2003), eine Kollagenmatrix (MACI) (Behrens et al, 2000) oder durch ein Polymervlies (Rudert et al, 2003), eine dreidimensionale Umgebung geschaffen werden soll.

Inzwischen werden auch Versuche mit mesenchymalen Stammzellen durchgeführt, um eine Differenzierung der Zellen in Richtung chondroblastärer Zelllinien zu bewirken (Richter et al, 2002; Nöth, Hendrichs et al, 2002, 2003).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit einem Teilgebiet dieses weiten Forschungsbereiches, der unter dem Begriff des Tissue Engineering zusammenzufassen ist.

## **1.2 Knorpel**

Knorpel gehört histologisch Betrachtet zu den Binde- und Stützgeweben und zeichnet sich durch vier charakteristische Eigenschaften aus:

- formgebende Wirkung
- Gewicht zu tragen und Gleitbewegungen zu ermöglichen
- Druckelastizität und
- Schneidbarkeit

Die formgebende Eigenschaft des Knorpels spielt bei der Knochenentwicklung als Vorläufer des späteren Knochens eine wichtige Rolle.

Die Fähigkeit Gewicht zu tragen und die spiegelnd glatten Oberflächen der hyalinen Gelenkknorpel, ermöglichen das Gleiten von Skelettanteilen gegeneinander.

Die hohe Druck- und Zugfestigkeit des Knorpels schafft eine Art Stoßdämpfereffekt. Der Knorpel ist in der Lage nach Belastung wieder in seine Ausgangsform zurückzukehren (Junqueira et al, 1996).

Morphologisch betrachtet ist Knorpel durch Chondrozyten und, je nach Knorpelart, durch charakteristische Interzellulärsubstanz gekennzeichnet.

Es gibt drei verschiedene Knorpelarten: hyalinen Knorpel, Faserknorpel und elastischen Knorpel. Im folgendem soll nur auf den hyalinen Knorpel eingegangen werden.

## **1.3 Hyaliner Gelenkknorpel**

### **1.3.1 Funktion und Eigenschaften**

Hyaliner Knorpel ist die am häufigsten vorkommende Knorpelart im menschlichen Körper. Im nativen Präparat erscheint der hyaline Knorpel bläulich-weiß und zart durchschimmernd. Er kann als eine Art zusammengesetztes Gel betrachtet werden, das nur zu 0,01-0,1% (Fassbender et al, 1982) bis 2% (Maroudas et al, 1986) aus Chondrozyten besteht, die in eine reichhaltige extrazelluläre Matrix eingebettet sind, welche aus Wasser, Glykanen und Kollagen besteht.

Im Embryonalalter bildet er zeitweise das Skelett und wird mit steigendem Entwicklungszustand in Knochen umgebaut. Zurück bleibt er zunächst in den

Epiphysenfugen, wo er hauptsächlich dem Längenwachstum der Röhrenknochen dient. Im adulten Organismus kommt der hyaline Knorpel überwiegend an artikulierenden Gelenkoberflächen, der Trachea und Bronchi, sowie am ventralen Rippenansatz vor.

Kennzeichnende Eigenschaften des hyalinen Knorpels sind seine Druckelastizität und seine Zugelastizität in gewissen Grenzen, unter Beibehaltung seiner Flexibilität. Ohne diese Eigenschaften wäre das Gewebe nicht in der Lage seinen Hauptaufgaben im Körper zu genügen (Junqueira et al, 1996). Die Dicke des Knorpels in einem Gelenk variiert je nach Gelenk, sowie interindividuell. So beträgt sie an Fingergelenken ca. 1 mm, am Hüftkopf ca. 2-3 mm und an der patellaren Gleitfläche des Kniegelenks bis zu 8 mm Dicke (Tillmann et al, 1998).

Als Gelenküberzug erfüllt der hyaline Knorpel folgende Funktionen (Poole et al, 1993):

- Schutz des subchondralen Knochens vor Abrieb, Impressionsfrakturen und anderen Schäden.
- Verteilung der Druck- und Scherkräfte auf die am Gelenk beteiligten Knochenstrukturen.
- Verbesserung der Kongruenz der artikulierenden Gelenkflächen
- Herabsetzung des Reibekoeffizienten in Verbindung mit der Synovialflüssigkeit.

Diese für das Knorpelgewebe typischen Eigenschaften, werden durch chemische und physikalische Interaktionen der am Gewebeaufbau beteiligten Strukturelemente gewährleistet.



### **1.3.2 Bestandteile**

#### **1.3.2.1 Chondrozyten**

Ein Chondrozyt ist per Definition eine Zelle, welche ihre umgebende Matrix produziert oder erhält. Der am häufigsten vorkommende Chondrozyt ist der im hyalinen Gelenkknorpel, welcher uns in dieser Studie interessierte (Battmann et al, 2003). Knorpelzellen liegen bevorzugt einzeln oder in kleinen geradzahligen Gruppen in sogenannten Knorpelhöhlen (Chondrone). Die Zellgruppen entstehen durch Mitose einer Knorpelzelle und werden deshalb als isogene Gruppen bezeichnet. Innerhalb einer Gruppe kann man den Reifegrad einzelner Chondrozyten aufgrund ihres Aussehens unterscheiden.

Die Zellen weisen einen hohen Organellenreichtum, v.a. rauhes endoplasmatisches Retikulum und große Golgi-Apparate, auf, was auf eine hohe Kohlenhydrat- und Proteinsynthese hinweist und durch die große Menge an Proteoglykanen und Kollagen Typ-II Produktion bestätigt wird.

Die Ernährung der Chondrozyten erfolgt über Synovialflüssigkeit per diffusionem, da die Blutkapillaren bereits im Perichondrium enden.

Umgeben werden die Chondrone von Knorpelgrundsubstanz (Matrix) (Junqueira et al, 1996).

Die Hauptfunktion der Chondrozyten besteht in (Buckwalter et al, 1993):

- Synthese von Matrixmolekülen
- Ersatz von zugrundegegangenen Makromolekülen
- Variation der Netzwerkzusammensetzung
- Adaptation an veränderte Ansprüche an das Knorpelgewebe

Weiterhin findet man Knorpelzellen während der Knochenentwicklung und Knochenreparaturvorgängen. Bei der Knochenentstehung findet man Chondrozyten bis zum Ende der Knochenentwicklung in den Wachstumszonen der langen Röhrenknochen. Diesen Prozess bezeichnet man als enchondrale Ossifikation. Nach Ende des skelettalen Wachstums, kann man Chondrozyten nach Knochenfrakturen in Kallusgewebe finden (Junqueira et al, 1996).

Chondrozyten folgen einem festgelegten Weg der Differenzierung. Ausgehend von der Stammzelle verändern sie ihre Morphologie zum frühen Chondroblasten (engl.: proliferating chondroblast). Seine Hauptaufgabe ist die mitotische Teilung um eine suffiziente Anzahl an Zellen zu produzieren, die ausreichend extrazelluläre Matrix herstellen. Wenn genug Zellen produziert wurden, entwickelt sich der frühe Chondroblast zum Matrix produzierenden Chondroblast (engl.: producing chondroblast). Dieser Zelltyp generiert die Matrix der Gelenkoberfläche. Anschließend wird der Chondroblast zum letztendlichen Chondrozyten mit seinem typischen bizellulären Erscheinungsbild.

### **1.3.2.2 Knorpelgrundsubstanz**

Die auch als Interzellulärsubstanz oder extrazelluläre Matrix bezeichnete Knorpelgrundsubstanz besteht zu 60-70% aus Wasser. Die Trockensubstanz besteht zu etwa je 40-50% aus Kollagen (im wesentlichen Typ-II) und Glykanen (Hyaluronsäure und Proteoglykosaminoglykanen), sowie 10% Mineralien (Junqueira et al, 1996). Diese Komponenten sind in einem komplizierten Netzwerk aufgebaut, das die einzigartige Elastizität und Festigkeit bewirkt, was für die Funktion des Gelenkes unabdingbar ist. Die Chondrozyten bilden zwei Formen der Matrix: die territoriale Matrix und die interterritoriale Matrix. Die territoriale Matrix bildet lediglich eine Art Hof um den Chondrozyten. Sie enthält typische Matrixkomponenten, die aber noch nicht in die dreidimensionale Struktur eingebaut sind (Jee et al, 1988). Die interterritoriale Matrix hingegen ist der Hauptbestandteil des Gelenkknorpels und enthält die untereinander verknüpften Kollagene und Proteoglykane, die Wassermoleküle binden. Sie stellt das Endprodukt des Gelenkchondrozyten dar (Battmann et al, 2003). Die Halbwertszeit der Gelenkmatrix wird auf etwa 100 Jahre geschätzt (Aigner et al, 2002).

#### **1.3.2.2.1 Proteoglykane**

Proteoglykane bestehen aus einem Protein von ca. 2000 Aminosäuren. Dieses Protein wird als *core Protein* bezeichnet (Junqueira et al, 1996). An dieses Protein sind mehrere hundert Glykosaminoglykanketten gebunden, welche zum größten Teil aus repetitiven Disaccharideinheiten (Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat,

Keratansulfat) zusammengesetzt sind. Die Glykosaminoglykanketten sind so am *core Protein* angelagert, das eine flaschenbürstenartige Struktur entsteht (Löffler et al, 1999). Solch ein Proteoglykanmonomer, mit einem Molekulargewicht von  $1,5 - 2,5 \times 10^6$  Dalton, wird auch als *Aggrecan* bezeichnet.

Das Aggrecan ist mittels eines *link Proteins* an Hyaluronsäure, ein aus Disaccharideinheiten bestehendes, unverzweigtes Makromolekül, nichtkovalent gebunden, wodurch ein Proteoglykan-Hyaluronsäure-Molekül entsteht, mit einem Molekulargewicht von bis zu  $100 \times 10^6$  Dalton (Junqueira et al, 1996).

Das Hyaluronat und die Proteoglykane schaffen zusammen mit Kollagen ein dreidimensionales Netzwerk, welches durch Wechselwirkungen zwischen den unterschiedlich geladenen Aminosäureresten der Kollagene und der Proteoglykane seine Anordnung erhält (Löffler et al, 1999).

Da von hyalinem Knorpel eine hohe Elastizität und Druckbelastbarkeit gefordert wird, findet man hier eine große Menge an Aggrecanen (Proteoglykane mit gebundenen Glykosaminoglykanketten). Diese haben einen stark hydrophilen Charakter und formieren so Wassermoleküle zu einer mehrschichtigen Hydrathülle um sich herum. Bei hoher Druckbelastung kann Wasser aus den Ladungszentren verdrängt werden. Bei noch stärkerer Druckbelastung, rücken die negativ geladenen Gruppen noch enger zusammen und es kommt zu Abstoßungskräften, die einem weiteren Zusammendrücken des Knorpels entgegenwirken. Nimmt die Druckkomponente wieder ab, bindet das Wasser wieder an die negativen Ladungszentren (Löffler et al, 1999; Junqueira et al, 1996).

### **1.3.2.2.2 Kollagen**

Kollagene gehören zu den am meist verbreiteten Proteinen des Organismus. Sie sind für bestimmte Eigenschaften des Binde- und Stützgewebes von großer Bedeutung. Die wesentliche Funktion beruht darauf, mechanische Stabilität in die Struktur von Geweben und Organen zu bringen (Löffler et al, 1999).

Bei hyalinem Knorpel handelt es sich zu 90-95% um Kollagen Typ-II, dessen Durchmesser zwischen 2-400nm variiert und in die amorphe Grundsubstanz eingebettet ist (Junqueira et al, 1996). Neben Typ-II Kollagen kommen auch noch andere Typen vor wie z.B. Typ-XI, Typ-X, Typ-IX, Typ-VI, Typ-V und Typ-I.

Kollagen Typ-II gehört zu den Fibrillen-bildenden-Kollagenen, welche ca. 90% aller Körperkollagene bilden (Löffler et al, 1999). Da sie den gleichen Brechungsindex haben wie die übrige Matrix, sind sie im Nativpräparat unter dem Lichtmikroskop, nicht von der Umgebung abzugrenzen: sie sind *maskiert*. Erkennbar werden sie erst im polarisierten Licht durch ihre Anisotropie (Junqueira et al, 1996; Putz et al, 1994). Beim Aufbau der Kollagen lässt sich eine typische linksgängige Helix erkennen. Kollagen wird auch als Tripeptideinheit mit der Formel  $(\text{Gly-X-Y})_n$  charakterisiert, da annähernd jede dritte Aminosäure in der Polypeptidkette von Glycin repräsentiert wird. Eine solche Polypeptidkette wird auch als  $\alpha_1$ -Typ-II-Kette bezeichnet.

Beim Typ-II-Kollagen ergänzen sich je drei dieser linksgängigen  $\alpha_1$ -Typ-II-Ketten  $([\alpha_1\text{II}])_3$  Kollagenhelices zu einer rechtsgängigen Super- oder Triplehelix.

Wenn sich nun fünf dieser Triplehelices miteinander verbinden, entstehen sogenannte Mikrofibrillen. Durch die versetzte Zusammenlagerung entstehen sehr lange Kollagenfäden (Löffler et al, 1999).

Charakteristisch für Typ-II-Kollagen ist außerdem das Vorkommen von Hydroxylysin, welches einerseits die Tropokollagenmoleküle der Fibrillen verknüpft und andererseits auch die Disaccharide bindet. Dadurch entstehen die Verbindung der Kollagenfibrillen untereinander und auch die Verknüpfung zu den Aggrecanen in der Matrix (Junqueira et al, 1996).

Der Faserverlauf der Kollagenfäden ist in den verschiedenen Zonen unterschiedlich. In direkter Zellnähe gestalten die Fasern durch konzentrische Verläufe eine Art fibrillären Korb, der die Chondrozyten vor mechanischer Belastung und Deformierung schützt (Buckwalter et al, 1993). Beobachtet man den Verlauf der Fibrillen durch die Matrix, so kann man eine traktorielle Anordnung erkennen. Dadurch kommt es zu einer Verspannung des Knorpelanteils und er erhält eine gewisse Zug- und Druckfestigkeit. Auf diese Weise werden auch mehrere Knorpelzellnester zu Druckpolstern zusammengefasst (Putz et al, 1994). Die Bedeutung der Fasern auf die Eigenschaften des Gewebes haben Untersuchungen gezeigt, bei denen nach Einwirkung von Kollagenasen die Stabilität, sowie die notwendige Zug- und Druckfestigkeit, signifikant abnahm (Roth et al, 1980).

### 1.3.3 Struktureller Aufbau

Gelenkknorpel wird aufgrund seiner unterschiedlichen Bestandteile, wie Zellmorphologie, Fibrillenverlauf und Proteoglykanverteilung, in vier Zonen eingeteilt:

#### **Zone I:**

Die direkt an die Gelenkhöhle grenzende Schicht, wird als *Tangentialfaserzone* bezeichnet. Diese hat eine Dicke von wenigen 100µm und macht etwa 5-10% des Volumens aus (Poole et al, 1993). Am Übergang zur Gelenkkapsel, geht sie in die Membrana synovialis über (Drenckhahn et al, 1994). Mit Ihrer Längsachse parallel zur Oberfläche liegen die spindelförmigen Zellen, welche arm an rauhem endoplasmatischem Retikulum (rER), Mitochondrien und Golgi-Apparaten sind, was auf eine geringe Stoffwechselaktivität hinweist. Die Kollagenfibrillen verlaufen gebündelt entlang der Dehnungstrajektorien, parallel zur Oberfläche. Proteoglykane findet man nur sehr wenige zwischen diesen Strukturelementen (Tillmann et al, 1998; Weiss et al, 1968).

#### **Zone II:**

Diese Zone wird auch als *Übergangszone* bezeichnet. Sie macht etwa 40-45% des Volumens aus (Poole et al, 1993). Der Faserdurchmesser ist größer und die Kollagenfibrillen laufen kaum gebündelt. Der Faserverlauf ist in diesem Bereich durch ungerichteten Verlauf gekennzeichnet. Die Kollagenfibrillen zeigen ein typisches Überkreuzen. Große, ellipsoide Zellen bilden die charakteristischen Chondrone. Diese liegen uneinheitlich bis parallel zur Oberfläche (Drenckhahn et al, 1994; Tillmann et al, 1998). Im Gegensatz zur Tangentialfaserzone sind hier die Mitochondrien, das rER und die Golgi-Apparate in hoher Anzahl vertreten, was auf eine metabolisch hohe Aktivität hinweist (Weiss et al, 1968). Auch die Ausbildung sogenannter Filopodien, welche Matrixvesikel abschnüren und anschließen ihren Inhalt freisetzen, weisen auf erhöhte Stoffwechselaktivität hin (Fassbender et al, 1982).

**Zone III:**

Die *Radiärzone* enthält große, runde Zellen und macht etwa 40-45% des Volumens aus (Poole et al, 1993). In dieser Zone sind die Chondrone orthogonal zur Oberfläche in Säulen angeordnet. Dadurch läßt sich diese Zone gut identifizieren. Die Kollagenfibrillen verlaufen ebenfalls orthogonal zur Oberfläche und besitzen in dieser Zone den größten Durchmesser (Tillmann et al, 1998). Die Zahl der Zellorganellen, sowie die Stoffwechsellaage, entsprechen etwa der Übergangszone. Die Radiärzone enthält außerdem den höchsten Anteil an Proteoglykanen (Buckwalter et al, 1993).

**Zone IV:**

Die *Mineralisierungszone* hat eine Dicke von etwa 100µm (Drenckhahn et al, 1994) und macht 5-10% des Volumens aus (Poole et al, 1993). Diese Zone wird von Zone III durch eine wenige µm dicke Grenzzone (engl.: *tidemark*) getrennt (Drenckhahn et al, 1994). Diese stark verkalkte Linie wird von den radial verlaufenden Kollagenfasern durchbrochen, welche an der osteochondralen Begrenzung abrupt enden (Poole et al, 1993). Die Aufgabe oder Funktion der tidemark ist bisher noch nicht geklärt.

Angelagert an die dichten Fasern findet man Kalziumphosphatkristalle (Tillmann et al, 1998). Hier liegen die Chondrozyten als kleine, oft in Paaren zusammengelegene Zellen vor. Ihre metabolische Aktivität ist gering, ebenso wie ihre Dichte (Buckwalter et al, 1993; Tillmann et al, 1998). Durch die inhomogene Gestalt und Verteilung der Chondrozyten ist die Grenzfläche zum subchondralen Gewebe vergrößert, woraus sich eine feste Verbindung beider Gewebe ergibt (Poole et al, 1993). Die Fähigkeit zum Umbau oder Neubildung von Knochen, bleibt in gewissen Schranken erhalten. So kann der Knochen auf veränderte Gelenkbeanspruchung entsprechend reagieren (Drenckhahn et al, 1994). Die eigentliche Funktion dieser Zone ist es den bei Beanspruchung auftretenden Druck gleichmäßig vom verformbaren Knorpel auf das starre Knochengewebe zu übertragen (Tillmann et al, 1998).

Die wichtigsten Unterschiede der einzelnen Zonen sind noch einmal in Tabelle 1 zusammengefasst (Poole et al, 1993; Tillmann et al, 1998):

**Tabelle 1: Zonengliederung des Gelenkknorpels mit schematischer Darstellung (Poole et al, 1993; Tillmann et al, 1998)**

	<b>Zone I</b>	<b>Zone II</b>	<b>Zone III</b>
<b>Chondrozyten:</b>			
Zelldichte	+++	++	++
Form	spindelförmig	oval	rundlich
Ausrichtung	tangential	willkürlich	radial
<b>Matrix:</b>			
Aggregate	+	+++	++
Keratansulfat	+	++	+++
Ladungsdichte	+	+++	++
Kollagen	+++	++	++
Faserdicke	fein	mittel	grob
Faserverlauf	tangential	schräg	radial
<b>mech.</b>			
<b>Eigenschaften:</b>			
Zugfestigkeit	++++	++	+
Verformbarkeit	+	+++	++

Diese Zonengliederung entspricht im Allgemeinen dem schon 1925 von Benninghoff (Benninghoff et al, 1925) beschriebenen Arkadenschema des Gelenkknorpels. In der kalzifizierenden Zone sind die Fibrillen fest verankert, steigen senkrecht in Richtung Gelenkfläche auf, wechseln ihre Verlaufsrichtung im oberen Drittel und befinden sich schließlich in der Tangentialfaserschicht parallel zur Oberfläche (Tillmann et al, 1998; Weiss et al, 1968).

### 1.3.4 Besonderheiten des Knorpelstoffwechsels

Gelenkknorpel enthält weder Blut- noch Lymphgefäße, noch ist er innerviert (Poole et al, 1993). Eine Nährstoffversorgung kann somit nur aus dem blutgefäßreichem Knochenmarkraum (*subchondral drift*) oder den Blutgefäßen der Gelenkinnenhaut (*synovial drift*) erfolgen. Der durch Verkalkungszonen weitgehend abgedichtete Markraum spielt beim Erwachsenen für die Versorgung jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Entscheidend scheint die Versorgung über den synovialen Weg zu sein. Dieser Weg allerdings bedeutet eine lange Transportstrecke. Von den synovialen Kapillaren werden die Nährstoffe über das Synovialgewebe zur Synovialflüssigkeit transportiert und erreichen schließlich die Knorpelgrundsubstanz. An jeder dieser Stationen können Störungen entstehen, welche die Versorgung des Knorpels bzw. der Zellen gefährden (Fassbender et al, 1982; Niethard et al, 1997). Dieser gesamte Prozess verläuft passiv durch Diffusion. Die wassergefüllten Poren der Matrix, welche einen Durchmesser von etwa 2nm haben, können von Nährstoffkomplexen, die eine Größe von 0,3-0,5nm haben, uneingeschränkt passiert werden. Auf diese Weise entsteht ein beträchtlicher Gradient der einzelnen Substanzen. Der Sauerstoffgehalt des Knorpels beträgt 1mm unter der Oberfläche nur noch etwa ein Drittel dessen der Synovialflüssigkeit. 2mm unter der Oberfläche beträgt er noch ein Zwanzigstel. D.h., der Sauerstoffgehalt im Gewebe ist so niedrig, daß die Energiegewinnung der Zellen vorwiegend auf anaerobem Wege abläuft (Lee et al, 1997; Maroudas et al, 1986).

Damit die Substratversorgung auch in den tiefen Schichten des Knorpelgewebes gewährleistet werden kann, ist eine ausreichende Gelenkbewegung unabdingbar. Diese intermittierende Druckbelastung und Druckentlastung stellt einen Erhaltungsreiz für den Knorpel dar. Typische Folgen einer längeren Immobilisation sind Trophikstörungen (Debrunner et al, 1994). Durch entsprechende Be- und Entlastung des Knorpels, kommt es zum Auspressen bzw. Einwalken von Synovialflüssigkeit, welche die Nährstoffe enthält. Die extrazelluläre Matrix wird durch Druck umgeordnet, Flüssigkeit wird aus dem Gewebe verdrängt und das Volumen nimmt ab. Bei Entlastung wird frische Synovialflüssigkeit angesaugt und das Spannungsgleichgewicht ist wieder hergestellt. Die Stärke und Frequenz der Druckeinwirkung bedingen die Flußgröße eines solchen Belastungszyklus (Maroudas et al, 1986).



## 1.4 Physiologische Gewebeeralterung und Regenerationspotential

Die Struktur, die Zusammensetzung und somit die Eigenschaften des Knorpels werden bei fortschreitendem Lebensalter verändert. Es ist eine Verminderung der Zellzahl, der Aggregatgröße, sowie des Wassergehaltes zu beobachten. Das Gleichgewicht zwischen Fasern und Proteoglykanen verschiebt sich zum Nachteil der Proteoglykane. Da die Halbwertszeit der Kollagene länger ist als die der Proteoglykane und die Stoffwechselaktivität der Chondrozyten weniger geworden ist, wird nicht genügend Proteoglykan nachgebildet um das Gleichgewicht wieder herzustellen. Es entsteht die sogenannte *Demaskierung* der Kollagenfibrillen.

Knorpeldegeneration, im Allgemeinen als Arthrose bezeichnet, ist hauptsächlich bei Gelenkknorpel zu beobachten. Zu den Hauptrisikofaktoren zählen Übergewicht und Alter (Martin et al, 2002). Dadurch neigt der Knorpel zu Abnutzung und zur Zerreißung. Regenerationsprozesse, wie sie in anderen Organen, der Leber zum Beispiel, anzutreffen sind, scheinen nicht zu existieren (Battmann et al, 2003). Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, daß Störungen der Gelenkmechanik im gesunden Gelenk eine Arthrose ankurbeln können. Beispielsweise bewirken die Menisci eine Verteilung des Gewichtes über die gesamte Gelenkoberfläche. Wird der komplette Meniscus, oder ein Teil eines Meniscus, entfernt oder zerstört, entsteht eine ungleiche Druckverteilung über der Gelenkoberfläche und es entwickelt sich eine höhere Kompression über Teilen der Matrix. Dies führt zu einer Verhärtung der Matrix und zu einer verminderten Diffusion von Nährstoffen, wodurch die Chondrozyten nur noch unzureichend arbeiten können. Die Matrix geht infolge des mechanischen Stress zugrunde. Es entstehen die schon genannten Demaskierungen der Kollagenfibrillen und Auffaserungen der Knorpeloberfläche (Kurz et al, 2001). Die Chondrozyten reagieren darauf mit für solche Arthroseareale typische Zellclusterbildung. Diese Clusterformation der Chondrozyten muss als Indikator und fehlgeschlagenen Versuch eines Reparaturvorganges angesehen werden. Chondrozyten scheinen Zellen für ein ganzes Leben zu sein, was schon durch die lange Halbwertszeit der Matrix impliziert wird. Dennoch findet man im Kallusgewebe der Knochenfrakturheilung scheinbar neu entstandene Knorpelzellen, die allerdings nach abgeschlossener Heilung wieder komplett verschwinden. Dies suggeriert, daß es im Knochengewebe immer noch einen Stammzellpool zu geben

scheint, der in der Lage ist, diese Knorpelzellen zu generieren (Battmann et al, 2003).

Eine Regeneration ad integrum kommt bei geschädigtem Knorpelgewebe nicht vor. Die Defekte werden lediglich von einem fibrokartilaginärem Narbengewebe ausgefüllt. Diese Gewebe besteht aus einer fibrösen Narbe, sowie aus Gewebe mit kartilaginären Eigenschaften, das auch knorpelspezifische Kollagene (z.B.: Kollagen Typ-II) produziert (Tew et al, 2001).

## **1.5 Osteoarthritis**

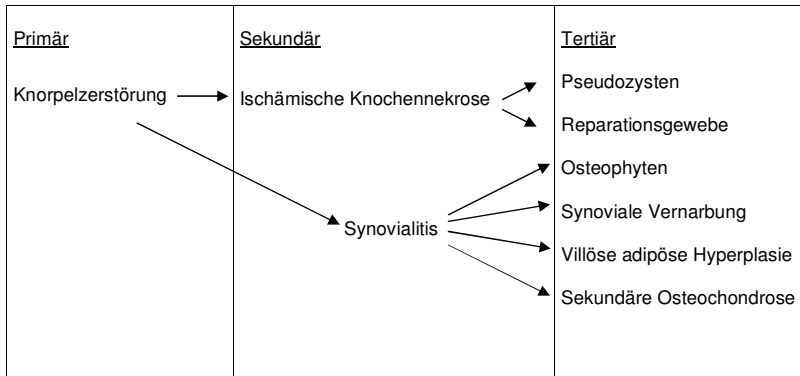
Osteoarthritis beschreibt einen Komplex aus subjektiven Beschwerden sowie radiologisch und histologisch erkennbaren Veränderungen.

Nach allgemeinem Kenntnisstand, wird die Osteoarthritis als: „degenerative Gelenkerkrankung, die vorwiegend bei einem Mißverhältnis zwischen Beanspruchung und Beschaffenheit bzw. Leistungsfähigkeit der einzelnen Gelenkanteile und -gewebe entsteht“ (Pschyrembel, 2004). Das homöostatische Gleichgewicht zwischen Synthese der physiologischen Matrixkomponente und Degeneration ist gestört, welches für die funktionelle Integrität des Gelenks unabdingbar ist.

Für die Entstehung eines solchen Ungleichgewichtes, werden viele Faktoren beschrieben. Hierbei spielen Traumata wohl die größte Rolle, bei denen durch die resultierende, auch oftmals nur sehr geringe, Fehlstellung im Gelenk eine Fehlbelastung des Gelenkknorpels entsteht (Grelsamer et al, 1995; Wedge et al, 1991).

Anhand der morphologischen Veränderungen lassen sich verschiedene Stadien der Osteoarthritis unterscheiden. Die Knorpelzerstörung mit einem Glanzverlust, gelblichen Verfärbungen und Knorpelweichung, lassen sich als primäres Stadium beschreiben (Ferguson et al, 1964). Vom sekundären Stadium spricht man, wenn es ischämiebedingt, bereits zu einem Untergang der Osteozyten in der oberflächlichen Zone des Knochens gekommen ist (Sokoloff et al, 1980; Bitounis et al, 1990).

Weitere Stadien sind in Abbildung 1 ersichtlich.



**Abbildung 1: Arthrotische Gelenkumgestaltung (Mohr, 2000)**

## 1.6 Core binding factor (Cbf)

Der Core binding factor (Cbf), auch als Polyomavirus enhancer binding protein 2 (PebP2) bezeichnet, ist ein Transkriptionsfaktor der sich aus einer  $\alpha$  und einer  $\beta$  Untereinheit zusammensetzt. Die  $\alpha$  Untereinheit ist strukturell homolog zu dem Produkt des *Drosophila* Gens *runt*. Es enthält eine Region, die als *Runt domain* bezeichnet wird. Diese Domäne wird zur DNA Bindung, als auch zur Dimerisation mit der  $\beta$  Untereinheit benötigt.

Bei Säugetieren sind drei Gene mit einer  $\alpha$  Untereinheit bekannt: Cbfa1/Pebp2 $\alpha$ A, Cbfa2/Pebp2 $\alpha$ B und Cbfa3/Pebp2 $\alpha$ C (Ito et al, 1999).

Entdeckt wurde Cbfa1 erstmals bei dem Versuch, einen Transkriptionsfaktor zu identifizieren der an der Entwicklung und Differenzierung biologischer Prozesse beteiligt ist (Ito et al, 1996; Ito et al, 1997). Im Einzelnen haben Studien, bei denen spezifische Gensequenzen inaktiviert wurden, die Bedeutung von Cbf in der Entwicklung verdeutlicht. So resultierte aus einer Inaktivierung des Cbfa1 bei sogenannten knock-out Mäusen (homozygot), ein vollständiges Fehlen der Knochenbildung (Komori et al, 1997; Otto et al, 1997; Rodan et al, 1997). Bei Cbfa2 knock-out Mäusen resultierte eine maßgebliche Hämatopoiesestörung aller Zelllinien (Okuda et al, 1997; Wang et al, 1996). Die beobachteten Phänotypen dieser knock-out Mäuse trugen dazu bei, Cbfa1 und Cbfa2 als Regulationsgene der Osteogenese und Hämatopoese anzuerkennen (Ito et al, 1999).

### 1.6.1 Biologische Funktion der $\alpha$ Untereinheiten

- **Cbfa1/Pebp2 $\alpha$ A**

Gezielte Inaktivierung von Cbfa1 (Ogawa et al, 1993) in Mäusen führte zu einer mangelhaften Osteoblastenreifung und einem vollständigen Ausbleiben der Knochenentwicklung. Allerdings waren diese Mäuse auch nur kurze Zeit lebensfähig aufgrund einer sich entwickelnden respiratorischen Insuffizienz. Heterozygote Mäuse jedoch waren lebensfähig und zeigten eine Reihe von skelettalen Veränderungen die phänotypisch einem menschlichen Leiden entsprechen, das man als *cleidocranial dysplasia* (CCD) bezeichnet (Komori et al, 1997; Otto et al, 1997; Mundlos et al, 1996). Dieses Syndrom ist charakterisiert durch multiple skelettale Abnormalitäten wie: persistierende offene Fontanellen, fehlende oder hypoplastische Os claviculare, überzählige Zähne, Kleinwuchs und weitere weniger bedeutsame Malformationen des Skeletts (Mundlos et al, 1997). Dies deutet an, daß Cbfa1 eine essentielle Rolle in der Osteogenese spielt (Komori et al, 1997; Otto et al, 1997). Das Cbfa1 Gen ist dem Chromosom 6p21 zugeordnet (Ito et al, 1999; Levanon et al, 1994; Lee et al, 1997; Zhang et al, 1997). Dieser Genlocus entspricht auch der autosomal dominanten humanen Knochenkrankheit CCD (Mundlos et al, 1995).

- **Cbfa2/Pebp2 $\alpha$ B**

Gezielte Inaktivierung von Cbfa2 (Miyoshi et al, 1991; Bae et al, 1993) in Mäusen führt zu starken Blutungen, besonders im zentralen Nervensystem. Dies deutet darauf hin, daß Cbfa2 eine Rolle bei der Blutgefäßentwicklung spielt. Außerdem kommt es zu einer vollständigen Blockade der Hämatopoese in der foetalen Leber (Okuada et al, 1996; Wang et al, 1996). Cbfa2 ist auf dem humanen Chromosom 21 lokalisiert. Es ist auch bei chromosomalen Translokationen zu finden, die in Verbindung mit Leukämie gebracht werden. Eine Translokation in t(8;21) und in t(12;21) findet man bei der akuten myeloischen Leukämie und der lymphoblastären Leukämie. Die Translokation in t(3;21) (Nucifora et al, 1993; Mitani et al, 1994) wird mit dem myelodysplastischen Syndrom in Verbindung gebracht.

- **Cbfa3/Pebp2αC**

Die einzige dokumentierte Funktion des Cbfa3 ist die Stimulation des Immunglobulin (Ig) Cα Promotors (Shi et al, 1998).

Die Stimulation des IgCα Promotors ist Voraussetzung für den Immunglobulin switch zum IgA. TGF-β ist in der Lage den Promotor IgCα zu stimulieren. Da die auf TGF-β reagierende Region des IgCα mit Cbfa3 assoziiert ist, wird dem Cbfa3 hier eine Funktion im Bereich des IgCα Promotors zugeschrieben.

### **1.6.2 Die Rolle des Cbfa1 in der Chondrogenese**

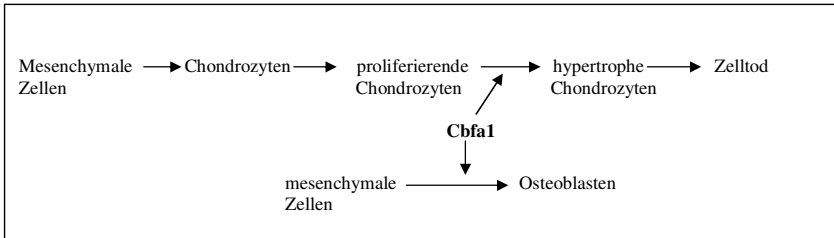
An der Skelettentwicklung sind zwei komplizierte Prozesse der Knochenbildung beteiligt. Zum einen die desmale Ossifikation und zum anderen die enchondrale Ossifikation. In Zonen der desmalen Ossifikation (Schädel, Mandibel) wird der Knochen direkt durch Differenzierung von Vorläuferzellen in Osteoblasten generiert. Bei der enchondralen Ossifikation (Röhrenknochen, Wirbelkörper) wird vor der eigentlichen Knochenbildung ein Knorpelmodell angelegt, welches anschließend durch Knochen ersetzt wird (Junqueira et al, 1996). Während dieser Phase spielen Chondrozyten eine entscheidende Rolle.

In Zonen, die eine enchondrale Ossifikation durchlaufen, gruppieren sich undifferenzierte mesenchymale Stammzellen zusammen, um die Ordnung des zukünftigen Knochenelements anzunehmen. Diese noch undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen, inmitten der gruppierten Ordnung, differenzieren zu Chondrozyten, die jetzt auch knorpelspezifische Proteine, wie z.B. Kollagen Typ-II, bilden. Die peripher gelegenen Zellen differenzieren zu fibroiden Zellen, die das Perichondrium bilden. Sobald diese Differenzierung stattgefunden hat, beginnen die zentral gelegenen Chondrozyten zu proliferieren und extrazelluläre Matrix zu bilden. Sie stoppen schließlich Ihre Proliferation und hypertrophieren. In der extrazelluläre Matrix beginnen sich Hydroxyapatitkristalle zu bilden, vermutlich aufgrund der schlechten Ernährung der Interzellularsubstanz, welche zu einer Kalzifizierung des Knorpels führen (Junqueira et al, 1996). Zur gleichen Zeit beginnen die peripher gelegenen fibroiden Zellen sich zu Osteoblasten zu differenzieren. Diese bilden nun um den kartilaginären Kern eine knöcherne Hülle (Caplan et al, 1987).

Die hypertrophen Chondrozyten lassen sich in zwei Untereinheiten einteilen. Zum einen die prähypertrophen Chondrozyten, welche vorwiegend Kollagen Typ-II synthetisieren und zum anderen, die hypertrophen Chondrozyten, die überwiegend Kollagen Typ-X synthetisieren (Linsenmayer et al, 1991; Mundlos et al, 1994; Vu et al, 1998). Die extrazelluläre Matrix, welche die hypertrophen Chondrozyten umgibt, bedingt nun ein Einsprossen von Blutgefäßen, mit anschließendem Abbau des kalzifizierten Knorpels durch Chondroklasten (Gerber et al, 1999; Takeda et al, 2000). Die kartilaginäre Matrix wird jetzt durch Kollagen Typ-I ersetzt, das von eingewanderten Osteoblasten produziert wird. Dieser Ossifikationsprozeß schreitet in zentripetaler Richtung voran und baut somit das Knorpelmodell von außen nach innen um. Die Abfolge dieser Vorgänge demonstriert die zentrale Rolle der hypertrophen Chondrozyten als eine unabdingbare Stufe zwischen dem kartilaginärem Gerüst und echtem Knochen.

Die Proliferation und Differenzierung verschiedener Chondrozytenuntereinheiten wird durch ein komplexes Netzwerk regulatorischer Moleküle initiiert und kontrolliert. Ein Faktor, der eine Kontrollfunktion in der Chondrozytenhypertrophie einzunehmen scheint, ist das Cbfa1. In der frühen Skelettentwicklung wird Cbfa1 von sich zum Knorpelgerüst gruppierenden mesenchymalen Zellen in großer Menge exprimiert (Ducy et al, 1997) (vgl. Abbildung 2). Da Cbfa1 auch für die spätere Osteogenese nötig ist, exprimieren die Zellen weiterhin osteoblastenspezifisches Cbfa1, allerdings in geringerem Maße als bei der frühen Knochenentwicklung (Komori et al, 1997; Otto et al, 1997; Inada et al, 1999; Kim et al, 1999).

Die Hypothese, daß Cbfa1 eine mögliche Regulationsfunktion bei der Hypertrophie der Chondrozyten sein könnte, wurde durch Analysen an Cbfa1 knock-out Mäusen gestärkt. Diese Tiere zeigten neben der fehlerhaften Skelettbildung auch eine fehlerhafte Differenzierung ihrer hypertrophierten Chondrozyten (Inada et al, 1999; Kim et al, 1999).



**Abbildung 2: Differenzierungsweg von Chondrozyten und Osteoblasten**

Modifiziert nach Benoit de Crombrughe (Crombrughe et al, 2001)

## 1.7 Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)

Das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) katalysiert die Synthese der Mononukleotide Inosinmonophosphat und Guaninmonophosphat aus den Purinbasen Hypoxanthin und Guanin im Purinstoffwechsel. In der Zellkultur besteht der Vorteil darin, daß das Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase-Gen, die kodierenden Sequenzen für das Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase-Protein, kein essentielles Gen ist. In Kultur müssen Zellen die Purine nicht über den Purinstoffwechsel nutzen, sondern können sie auch de novo synthetisieren (Bradley et al., 1981). In dieser Studie wurde das HPRT-Gen als Housekeeping-Gen verwendet. In dieser Referenzwertfunktion wird es auch als sehr geeignet angesehen (Vandesompele et al. 2002).

## 2 Fragestellung

In dieser Studie beschäftigten wir uns mit einem Teilgebiet des Tissue Engineering - einem kleinen Zweig des weiten Forschungsbereiches der Knorpelchirurgie.

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression des Core binding factor  $\alpha 1$  (Cbfa1) unter verschiedenen Kulturbedingungen bei humanen gesunden und arthrotischen Gelenkchondrozyten zu untersuchen.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Besteht ein Unterschied in der Cbfa1 Expression zwischen Chondrozyten gesunder und arthrotischer Herkunft?  
In unserer Studie ist das Anfangsniveau der Cbfa1 Expression der Chondrozyten, unmittelbar nach der Isolierung aus dem Gewebsverbund, von Interesse. Dieser Wert wird uns als Ausgangswert dienen.
- Hat die Kulturdauer unterschiedliche Effekte auf Cbfa1 die Expression der Chondrozyten gesunder und arthrotischer Herkunft?  
Die Cbfa1 Expression der arthrotischen und gesunden Kulturen wird zu definierten Zeitpunkten gemessen werden und in Relation zum gemessenen Ausgangswert gesetzt, um ggf. auftretende Veränderungen festzustellen.
- Können unterschiedliche Kultursysteme (zwei- bzw. dreidimensional) die Cbfa1 Expression in Chondrozyten gesunder und arthrotischer Herkunft beeinflussen?  
In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die Kombination aus zweidimensionalen und dreidimensionalen Kulturmodellen, ein geeignetes System zur Vermehrung und Züchtung von Chondrozyten im Bezug auf die Cbfa1 Expression darstellt.



### 3 Material und Methode

#### 3.1 Gewinnung des Knorpelmaterials

Das Knorpelgewebe für diese Untersuchungen wurde bei orthopädischen Kniegelenksoperationen gewonnen (ein „informed consent“ der Patienten nach Kriterien der Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität lag vor). Es handelte sich sowohl um arthrotisches, als auch um gesundes humanes Gewebe, welches zumeist bei der Implantation von Endoprothesen entfernt wurde. Je Gruppe wurden n=5 Kulturen untersucht.

Das Gewebe wurde mitsamt dem subchondralen Knochengewebe in Form von Knorpel-Knochenspänen oder im Verbund (d.h. Femurkondylen) unter sterilen Bedingungen entnommen (siehe Tabelle 2).

Das entnommene Material wurde dann bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C in Hank's Lösung aufbewahrt. Die Weiterverarbeitung erfolgte innerhalb von maximal drei Stunden nach Entnahme.

**Tabelle 2**

<b>Probe</b>	<b>Qualität</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Entnahmestelle</b>
g1	gesund	m	68 Jahre	dorsale Femurkondyle
g2	gesund	m	65 Jahre	dorsale Femurkondyle
g3	gesund	w	76 Jahre	dorsale Femurkondyle
g4	gesund	w	63 Jahre	dorsale Femurkondyle
g5	gesund	w	82 Jahre	dorsale Femurkondyle
a1	arthrotisch	w	76 Jahre	Facies retropatellaris
a2	arthrotisch	m	72 Jahre	Facies retropatellaris
a3	arthrotisch	w	74 Jahre	Facies retropatellaris
a4	arthrotisch	w	82 Jahre	Facies retropatellaris
a5	arthrotisch	m	81 Jahre	Facies retropatellaris

## 3.2 Zellkultur

### 3.2.1 Kulturmedium

Zur Herstellung des Mediums wurden in ein 10l fassendes Edelstahldruckgefäß 5l Aqua dest. und ein Rührfisch vorgelegt. Anschließend wurden unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer die notwendigen Substanzen dazu gegeben. Schließlich wurde das Volumen mit Aqua dest. auf 10l aufgefüllt.

Ansatz:

- DMEM/Ham's F12K Trockensubstanz
- 100ml Penicillin/Streptomycin (10.000IE/10.000µg/ml)
- 0,5g L-Ascorbinsäure ( $C_6H_8O_6$ )
- 31g  $NaHCO_3$  (Natriumhydrogencarbonat)
- 2 vials IST-Premix

Dieser Ansatz wurde ca. 2 Stunden auf dem Magnetrührer stehen gelassen um die Chemikalien vollständig in Lösung zu bringen. Die anschließende Druckfiltration wurde unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Hierzu wurde der Edelstahldruckbehälter über Schläuche mit einer Druckflasche und einem Sterilfilter verbunden. Der Druck wurde so geregelt, daß er 1,5 bar nicht überschritt, um die Materialeigenschaften nicht zu überlasten. Das so steril filtrierte Medium wurde in bereits vorbereitete, sterile Flaschen gefüllt und bei -20°C max. ein Jahr gelagert.

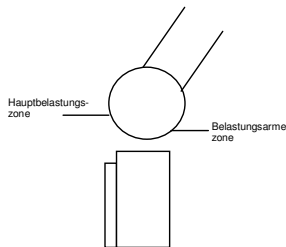
Um eine Kontamination auszuschließen wurden ca. 100-200ml des Filtrats zu Beginn und am Ende separat abgefüllt und für 6-8 Tage im Brutschrank gelagert. Wurde bei dieser Sterilitätsprüfung eine Verunreinigung festgestellt, wurde die Charge verworfen.

### 3.2.2 Zellgewinnung

Da in hyalinem Knorpelgewebe keine anderen Zellpopulationen, außer den Chondrozyten enthalten sind, bedurfte es keiner besonderen Methodik, um andersartige Zellen von den Chondrozyten zu trennen.

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterile Bedingungen unter der Microflow getätigt.

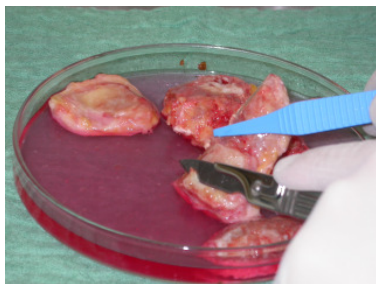
Das Operationsmaterial wurde mit sterilen Handschuhen und einer sterilen Pinzette aus der Hank's Lösung entnommen und auf einer Petrischale ausgebreitet.



**Abbildung 3 (Schema: Kniegelenk)**

Bei der Weiterverarbeitung des Gewebes wurde speziell darauf geachtet, dass es aus den entsprechend günstigeren anatomischen Gewebearealen des Operationsmaterials entnommen wurde. D.h., arthrotischer Knorpel wurde besonders von den Hauptbelastungszonen, gesunder Knorpel besonders von den belastungsarmen Zonen des Kniegelenks entnommen (Abbildung3).

Anschließend wurde der Knorpel mit einem Skalpell von der subchondralen Knochenschicht getrennt (Abbildung 4) und in ca. 1mm<sup>3</sup> große Würfel geschnitten



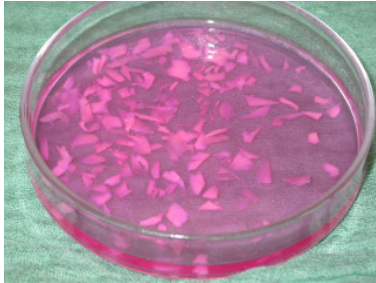
**Abbildung 4**

(Abbildung 5). Die Würfel wurden in ein 50ml Zentrifugenröhrchen transferiert. Um die Zellen von weiteren Bestandteilen, wie z.B. Blut und Fettgewebe zu trennen, wurden sie mehrere Male mit Hank's Lösung aufgeschwemmt und 5min mit 600-800U/min zentrifugiert. Die gewaschenen Knorpelwürfel wurden in einen 25ml Erlenmeyerkolben

überführt. Nun wurden die Chondrozyten enzymatisch aus der sie umgebenden Matrix mittels einer Kollagenaselösung (20mg

Kollagenase Typ-XI + 2,5mg Deoxyribonuclease mit 25ml DEME/Ham's F12K in Lösung gebracht) isoliert.

Die Kollagenaselösung wurde mittels eines Sterilfilters, in Form eines Spritzenaufsatzes, mit der Porengröße 0,20µm, steril zu den Knorpelstücken gegeben. Dieser Ansatz aus Enzymen und Knorpelgewebe wurde dann auf einen Magnetrührer gestellt und für vier Stunden bei 37 °C mit 600U/min gerührt.



Anschließend wurde der Überstand mit den darin enthaltenen Chondrozyten vorsichtig mit einer 10ml Pipette abgezogen und in ein 50ml

Zentrifugenröhrchen transferiert. Um Zellen und Enzymlösung voneinander zu trennen, wurde die Zellsuspension für 10min bei 800U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde noch zweimal mit 15ml Hank's Lösung aufgeschwemmt und erneut abzentrifugiert.

### 3.2.3 Bestimmung der Zellzahl

#### 3.2.3.1 Zählkammer nach Neubauer

Nach einer Lebendfärbung mit einer 0,4%igen Trypitanblau-Lösung (Sigma) wird die Zellzahl in einer Zählkammer bestimmt. Das Trypitanblau wird an Proteinstrukturen des Zytoplasmas angelagert. Da es jedoch nur in Zellen mit permeabler Zytoplasmamembran eindringen kann, werden nur tote Zellen angefärbt.

Ausgezählt werden zwei Großquadrate, die jeweils aus 16 kleineren Quadraten bestehen (Seitenlänge 0,25mm, Tiefe 0,1mm). Die Zellzahl ermittelt man mittels folgender Formel:

$$\frac{\text{gezählte Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10000}{\text{Anzahl ausgezählter Großquadrate}} = \text{Zellen/ml}$$

### 3.2.3.2 Elektronische Feinpartikelzählung

Die elektronische Feinpartikelzählung war in dieser Arbeit die Methode der Wahl. Das gewaschene Zellpellet wurde zur Bestimmung der Zellzahl der frisch isolierten Chondrozyten mit 10ml Hank's Lösung resuspendiert.

$$\text{Gesamtzellzahl} = n \times VF \times V_s \times 10$$

n: gemessene Zellzahl

VF: Verdünnungsfaktor = 20 (durch Verdünnung mit isotoner Kochsalzlösung)

V<sub>s</sub>: Volumen der Zellsuspension in ml

Zur Zellzählung wurden nun 500µl der Zellsuspension in 9,5ml isotone Kochsalzlösung gegeben. Dieser Ansatz wurde 10x mit unserem Zellzählgerät (Coulter Counter Feinpartikelzähler (Coulter Electronics Ltd., Luton, UK)) gemessen, um einen ausreichend genauen Mittelwert zu errechnen. Zur Messung wurden die Zellen in eine isotone, elektrisch leitende Lösung suspendiert und die Anzahl und Größenverteilung der Einzelpartikel bestimmt. Der Coulter Counter besteht aus einer Messkammer, in der Kathode und Anode in die Probenlösung tauchen. Da jedes Partikel eine Widerstandsänderung zwischen den Elektroden erzeugt, die proportional zur Partikelgröße ist, kann anhand der aufgenommenen Signale über die Zählzeit auf Größe (Impulshöhe) und Anzahl (Impulsanzahl) der Partikel geschlossen werden (Urban JP., 1993). Da bei jeder Messung lediglich 100µl durch das Gerät gemessen werden, wurde der errechnete Mittelwert mit 2000 multipliziert, um die Gesamtzahl der Chondrozyten in der 10ml Hank's - Zellsuspension zu ermitteln.

### 3.2.3.3 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein Verfahren, mit dem sich photometrisch eine quantitative Bestimmung der Zahl und Aktivität von Zellen durchführen läßt.

Da dieser Test auf einer aktiven Reaktion durch Mitochondrienenzyme basiert (Spaltung des Tetrazoliumringes), lassen sich folglich Reaktionen in vitalen Zellen nachweisen.

In dieser Arbeit diente der MTT-Test der Bestimmung der optimalen FKS-Konzentration vor Anlegen der Alginatkulturen. Es wurden sowohl für gesunde, als auch für arthrotische Chondrozyten, je drei Kulturen angelegt. Hierfür wurden in einer 48-Lochplatte 10.000 Zellen/well über 10 Tage kultiviert. Um das Wachstum bestimmen zu können, wurde jeden Tag die Extinktion mittels ELISA Reader (LAB-Systems, Hagedorn) gemessen. Die Messungen wurden mit den FKS-Konzentrationen: 5%, 10% und 20% durchgeführt.

Zunächst wurde eine Stammlösung hergestellt. Diese besteht aus einem Gemisch aus Thiazolblau ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-)-2,5 diphenyl]-tetrazoliumbromid) (Sigma, Deisenhofen) und 0,9%iger NaCl-Lösung im Verhältnis 5:1. Diese Stammlösung wurde dann mit Medium (DMEM/Ham's F12K) im Verhältnis 1:4 gemischt, um die Gebrauchslösung zu erhalten.

Bei den zu messenden Proben wurde am entsprechenden Tag das Medium aus dem well abgesaugt und 200µl MTT-Gebrauchslösung zugegeben. Die Proben wurden anschließend fünf Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert um die Reaktion ablaufen zu lassen, bei der das Tetrazoliumsalz von Dehydrogenasen zu Formazankristallen reduziert wird → braue Färbung. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde die MTT-Gebrauchslösung wieder abgezogen und 100µl DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma, Deisenhofen) in das well pipettiert, um die Formazankristalle aufzulösen. Die Platten wurden nun nach ca. 5-10min im ELISA Reader durch eine „Rüttelfunktion“ homogenisiert und anschließend gemessen. Die Messung der optischen Dichte dieser Lösung (blau-violette Färbung) erfolgte bei 520nm mit einer Referenzlänge von 690nm. Insgesamt wurde jede Probe dreimal gemessen. Mit dieser Methode läßt sich eine Aussage über die Vermehrung der Zellen machen, da die optische Dichte und die Anzahl der vitalen Zellen (Aktivität vitaler Mitochondrien) proportional zueinander sind (Mossmann T., 1983).

### **3.3 Alginat**

#### **3.3.1 Das Alginatsystem**

Chondrozyten, welche aus ihrer natürlichen Matrix herausgelöst und in Kultur gebracht werden, neigen zur Dedifferenzierung. In zweidimensionalen Monolayerkulturen entwickeln die Chondrozyten ein fibroblastisches Erscheinungsbild. Sie synthetisieren nicht mehr die knorpelspezifischen Komponenten, wie z.B. Kollagen Typ-II und Aggrecan (Komori et al, 1998, Ogawa et al, 1993), sondern Moleküle wie Kollagen Typ-I, Typ-III, Typ-V oder Versican, die man normalerweise in Fibroblasten oder Frühformen der Chondrozyten (Prächondrozyten) findet (Kania et al, 1990).

Daraufhin wurde ein dreidimensionales System zur Chondrozytenkultivierung entwickelt (Komori et al, 1997, Otto et al, 1997). Hierfür wurden die Zellen mit einer Alginatlösung in Suspension gebracht.

Die Chondrozyten wuchsen in dieser Umgebung, behielten ihren typischen Phänotyp über lange Zeiträume (Kim et al, 1999, Erlenbacher et al, 1995, Mundlos et al, 1996) und umgaben sich mit einer Matrix, die knorpelspezifische Moleküle wie Aggrecan, Decorin, Kollagen Typ-II (Hoshik et al, 1999) und Kollagen Typ-XI (Inada et al, 1999) enthielt. Gelenkchondrozyten in vivo bilden eine heterogene Matrix, die sich in eine perizelluläre, eine territoriale und eine interterritoriale Matrix einteilen läßt.

Gelenkchondrozyten, welche nun enzymatisch aus ihrer nativen Matrix gelöst wurden und anschließend in Alginatbeads kultiviert wurden, bildeten jetzt ebenfalls eine heterogene Matrix, die in vielerlei Hinsichten der eines nativen Knorpels entsprach (Kim et al, 1999, Mundlos et al, 1996). Dazu gehört die aufgegliederte Matrix, sowie das relative und absolute Volumen, welches von Zellen und Matrix eingenommen wird (Erlenbacher et al, 1995).

Die Möglichkeit die Chondrozyten, nach der Kultivierung, auf einfache Weise aus dem Alginatverbund zu lösen, schaffte die Voraussetzung, totale RNA aus humanen Chondrozyten zu isolieren. Diese RNA's sind normalerweise nur schwer von humanem Knorpel zu extrahieren, da sie sich nur unzureichend von den sie umgebenden Proteoglykanen separieren lassen, was wiederum weitere Analysen beeinflussen kann (Inada et al, 1999).

### 3.3.2 Herstellung der Alginatlösung

Eine besonders interessante Eigenschaft des Alginats ist die hohe Bindungsfähigkeit für Kationen. Hierbei handelt es sich um  $\alpha$ -L-Guluronat und  $\beta$ -D-Mannuronat, den Polysacchariden der Phaeophyceae (marine Braunalge).

In der Natur kommt das Polysaccharid Alginat in vielfältiger Funktion zum Einsatz. Es ist bei der Bildung von Pflanzengerüsten beteiligt (z.B.: Cellulose), aber auch im Panzer verschiedener Tiere (Chitin). Alginat dient auch als Energiespeicher (z.B.: Glykogen, Dextran, Stärke).

Das von uns benutzte Alginat wurde hergestellt, indem wir 1,5g „low viscosity“ Alginat in 100ml DMEM/Ham's F12K gaben und es bei 37°C für 1 Stunde auf dem Magnetrührer in Lösung brachten. Diese Lösung wurde im bei 121°C über 20min in wasserdampfgesättigter Atmosphäre autoklaviert. Diese gebrauchsfertige Alginatlösung wurde bei 4°C für maximal 14 Tage gelagert und verwendet.

### 3.3.3 Anlegen der Alginatkultur

Nachdem die Zellen für die Nativprobe entnommen waren, wurde die übrige Hank's – Zellsuspension für 10min bei 800U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit Alginatlösung resuspendiert, sodass eine Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt war.

Jetzt wurden die Chondrozyten in Kultur gebracht. Dazu wurde in jedes well einer 24-Lochplatte ca. 1ml einer steril filtrierten 102mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung vorgelegt. Nun wurde die Alginat-Zellsuspension mittels einer 10ml Spritze über eine Kanüle (Durchmesser 20Gx1½"; 0,9x40) aufgezogen und über eine Kanüle (Durchmesser 24Gx1"; 0,55x25) in die  $\text{CaCl}_2$ -Lösung eingetroppt. Es wurden ca. 10 beads/well eingetroppt. Damit die Alginatbeads ihre annähernd runde Form beibehielten, wurde die Kultur, nach der primäre Polymerisation, noch 10min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Jetzt wurde die  $\text{CaCl}_2$ -Lösung abgesaugt und die Alginatbeads noch 3x mit Hank's - Lösung gespült. Gelagert wurden die Zellen mit 1ml DMEM/Ham's F12K pro well mit 20% FKS bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$ .

Das Nährmedium wurde jeden dritten Tag gewechselt, um die von den Zellen verbrauchten Nährstoffe wieder zur Verfügung zu stellen.



### **3.4 Chondrozytenkultivierung**

#### **3.4.1 Gewinnung der Nativprobe (→Passage0/Tag0 = p0d0)**

Um ca.  $7,5 \times 10^5$  Chondrozyten für die Nativprobe zu gewinnen, wurde eine, nach der oben beschriebenen Formel, errechnetes Volumen Hank's-Zellsuspension in ein 25ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und für 10min bei 800U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde dann mit dem Lysepuffer, aus dem Protokoll für die RNA-Isolation des RNeasy<sup>®</sup> Kit's, resuspendiert, in ein 1,8ml Kryröhrchen transferiert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Lysepuffer hat die Aufgabe die Zellen zu zerstören um so die RNA, welche für die spätere Bestimmung der PCR gestützten Cbfa1 Konzentration, zugänglich zu machen. Für die spätere Weiterverarbeitung, wurde die Probe bei -70 °C aufbewahrt.

#### **3.4.2 Gewinnung der Verlaufsproben**

Um die Verlaufsproben aus der Kultur zu gewinnen, wurden nach 14 Tagen und nach 28 Tagen die Alginatbeads aus jeweils 8 der 24 wells aufgelöst (was einer Zellzahl von ca.  $1 \times 10^6$  Zellen entspricht), um die Chondrozyten zu gewinnen. Hierzu wurde das Nährmedium abgesaugt und die Alginatbeads in ein Eppendorf-cap überführt. Dann wurde der Auflöspuffer in der Dosierung 20-25µl pro Alginatbead dazupipettiert. Damit sich die Alginatbeads gut auflösten, wurden sie 30-60 min. im Auflöspuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie für 10 min. bei 800 U/min zentrifugiert. Die Zellen wurden noch 2-mal mit Hank's - Lösung aufgeschwemmt und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit dem Lysepuffer resuspendiert, in ein 1,8ml Kryröhrchen transferiert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so erhaltene Proben (Passege0/Tag14 = p0d14 und Passage0/Tag28 = p0d28) wurden für die spätere Weiterverarbeitung bei -70 °C aufbewahrt.

#### **3.4.3 Aufarbeiten der Kultur**

Am 28. Tag wurden die Alginatbeads der übrigen 8 Wells nach dem gleichen Protokoll aufgelöst, wie die Alginatbeads, die für die Verlaufsprobe bestimmt

waren. Die gewonnenen Zellen wurden jetzt in eine Monolayer-Kulturflasche gegeben und mit DMEM/Ham's F12K bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert. Das Nährmedium wurde jeden dritten Tag gewechselt, um die von den Zellen verbrauchten Nährstoffe wieder zur Verfügung zu stellen

Zum Lösen der Zellen aus der Monolayerkultur wurde, nachdem die Wachstumsfläche vollständig mit Chondrozyten besiedelt war, das Medium abpipettiert und die Zellen mit Hank's - Lösung gespült. Nun wurde der Zellrasen mit ca. 10ml Trypsin bedeckt und bei 37°C im Brutschrank solange inkubiert, bis sich alle Zellen von der Wachstumsfläche gelöst hatten.

Die Zellsuspension wurde dann in einem 50ml Zentrifugenröhrchen für 10 min. bei 800 U/min zentrifugiert und noch zweimal mit Hank's-Lösung gespült, um alles Trypsin zu entfernen. Nun wurden die Zellen nach oben beschriebener Methode gezählt und eine Probe, nach dem gleichen Procedere wie bei der Gewinnung der Nativprobe, entnommen (→ Passage1/Tag0 = p1d0).

Jetzt wurde die nächste Alginkultur angelegt und ebenso verfahren, wie bei der ersten Kultur. So wurden dann Passage1/Tag14 = p1d14 und Passage1/Tag28 = p1d28 gewonnen.

Ebenso wurde bei der letzten Passage vorgegangen um die Proben Passage2/Tag0 = p2d0, Passage2/Tag14 = p2d14 und Passage2/Tag28 = p2d28 herzustellen.

Das Prinzip des Versuchsaufbaus ist nochmals in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

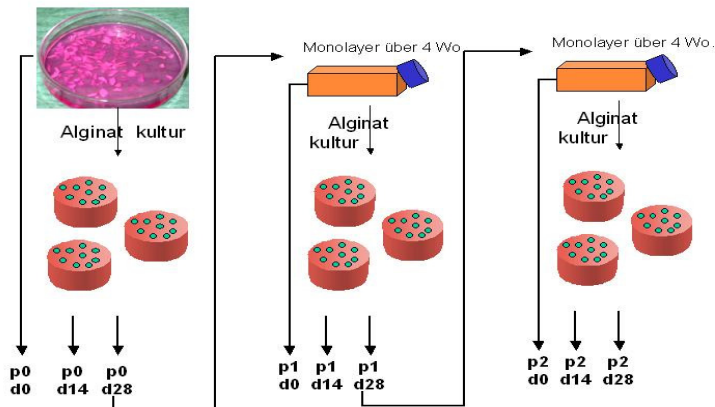


Abbildung 6: Kultur-Schema

### 3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### 3.5.1 Grundlagen der DNA – Replikation

Die informationstragenden Moleküle in biologischen Systemen sind die Desoxyribonukleinsäure (DNA) und die Ribonukleinsäure (RNA). Auf der DNA ist der gesamte genetische Code eines Organismus kodiert. Auf der RNA, die im Vergleich zur DNA wesentlich kürzer ist, sind lediglich Teile der genetischen Information enthalten. Die RNA stellt dem Organismus, zu einem gegebenen Zeitpunkt, die genetische Information zur Verfügung, die er benötigt, um die erforderlichen Makromoleküle herzustellen. Die Beziehung von DNA, RNA, Proteinen und der Verlauf des Informationsflusses, werden in der Molekularbiologie als *zentrales Dogma* bezeichnet. Im Einzelnen bedeutet dies:

- Die gesamte genetische Information einer Zelle ist auf der DNA gespeichert und muss bei der Zellteilung durch *Replikation* verdoppelt werden.
- Als *Transkription* bezeichnet man den Vorgang, bei dem Teile der auf der DNA gespeicherten Information in Form von RNA kopiert werden, um diese Informationen in der Zelle zu realisieren.
- Die auf der RNA repräsentierten genetischen Informationen werden durch den Vorgang der Proteinbiosynthese in die Aminosäuresequenz des Proteins übersetzt. Dieser Prozess wird *Translation* genannt.

Bestimmte Organismen, z. B. Viren, besitzen ein Enzym, das als Reverse Transkriptase bezeichnet wird. Die reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die in der Lage ist sowohl einzelsträngige RNA, wie auch DNA, als Matrizenstrang zu verwenden. Die reverse Transkriptase synthetisiert also die Kettenverlängerung am Matrizenstrang und bildet an der RNA einen komplementären DNA-Strang (cDNA = complementary DNA). Anschließend wird die cDNA mittels Hydrolyse von dem RNA-DNA Hybrid gelöst. Jetzt kann in einem zweiten Durchgang von der reversen Transkriptase ein vollständiger DNA-Doppelstrang synthetisiert werden.

Mit Hilfe dieses Enzym sind diese Organismen in der Lage das zentrale Dogma der Molekularbiologie zu unterlaufen und den Informationsfluss umzukehren (Löffler et al, 1996).

Die Tatsache, daß solche Enzyme existieren, hat man sich in der Molekularbiologie zu Nutze gemacht. Man verwendet diese Enzyme, um aus der in der Zelle vorhandenen RNA Konzentration, Rückschlüsse über die Genexpression einzelner Gene in Zellen, unter definierten Umständen zu ziehen.

### **3.5.2 Prinzip der PCR**

Zunächst wurde eine qualitative PCR durchgeführt. Dies war notwendig, um festzustellen, dass die aus den Chondrozyten entnommene Probe nicht kontaminiert worden war und frei von anderen Verunreinigungen war. Anschließend wurde eine quantitative PCR durchgeführt um die Expression von Cbfa1 in den über vier Wochen in Alginat kultivierten Chondrozyten zu ermitteln.

Die Polymerase Ketten Reaktion stellt eine *in vitro*-Technik dar, die es ermöglicht, gezielt bestimmte DNA-Abschnitte (Templates) zu vervielfältigen (amplifizieren) (Saiki et al, 1988; Mullis et al, 1990)

Entwickelt wurde diese Methode im Jahre 1985 von Kary Mullis, einem Mitarbeiter der Firma Cetus (*California*). Für diese Entdeckung erhielt er 1993 den Nobelpreis für Chemie. Zum Einsatz kam dieses neue Verfahren erstmals beim Nachweis des Sichelzellanämie-Gens durch Saiki et al (1985).

Um die Amplifikation starten zu können, müssen zwei einzelsträngige Oligonukleotide (Primer) vorliegen.

Diese müssen zum 3'-Ende des jeweiligen Templots, auf Strang und Gegenstrang, komplementär sein. Der zwischen den beiden Primern liegende DNA-Abschnitt wird durch eine hitzestabile DNA-Polymerase, in Gegenwart von einzelnen Desoxynukleotiden, komplementär zum Matrizenstrang in 5'→3'-Richtung synthetisiert (Löffler et al, 1999). Diese Vorgänge unterliegen einem dreistufigen Temperaturzyklus. Während eines Zyklus wird die Anzahl der DNA-Kopien jeweils verdoppelt. Die erste Stufe ist hierbei den DNA-Doppelstrang durch Erhitzen zu denaturieren. In der zweiten Stufe wird rasch abgekühlt, wobei sich die Primer spezifisch an ihre Zielregion anlagern (Annealing). Bei der dritten Stufe wird der Ansatz auf die Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase gebracht, welche mit den

Desoxynukleotiden den komplementären DNA-Strang synthetisiert (Extension). Jeder neusynthetisierte DNA-Strang dient im nächsten Zyklus als Matrizenstrang. Auf diese Weise ist eine Sequenz exponentiell amplifizierbar. In den ersten beiden Amplifikationszyklen haben die neu entstandenen DNA-Stränge noch keine definierte Länge, da die DNA-Polymerase so lange ihre Synthese fortsetzt, bis ihre Aktivität von alleine abnimmt oder von dem nächsten Amplifikationszyklus unterbrochen wird. Erst ab dem dritten Zyklus wird exakt der durch die beiden Primer begrenzte DNA-Abschnitt amplifiziert. Daher läßt sich die Anzahl der Kopien nach der Formel:  $(2^n - 2n) \times$  berechnen ( $n$  = Anzahl der Zyklen;  $2n$  = Produkt der ersten zwei Zyklen, deren Länge nicht definiert ist;  $x$  = Anzahl der ursprünglichen DNA-Matrizenstränge). Limitiert wird die DNA-Vermehrung durch den Verbrauch der Reaktionskomponenten, Verminderung der Polymeraseaktivität und Akkumulation der PCR-Produkte. Es tritt ein sogenannter „Plateau-Effekt“ ein (Morrison et al, 1994). In der Regel erreicht man mit 20-40 Zyklen eine ausreichende Menge der gewünschten DNA-Sequenz (Mullis et al, 1994; Bej et al, 1991).

Das Ergebnis wird durch eine Agarose-Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht, wobei die DNA-Banden mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid als diskrete Banden sichtbar werden.

### **3.5.3 Isolation der totalen RNA aus Chondrozyten**

Die Isolation der RNA aus den Chondrozyten erfolgte Mittels Qiagen RNeasy® Mini Kit. Die aus den Alginatkulturen gewonnenen Proben wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die Proben mit 350µl Ethanol (70%ig) homogenisiert. Das mit Ethanol gereinigte Lysat wurde jetzt in eine RNeasy® Spin Column überführt, damit sich die RNA an die in der Spin Column befindliche Membran binden konnte. Die Probe wurde für 15 sek. bei 10.000 U/min zentrifugiert.

Die noch immer an die Membran in der Spin Column gebundene RNA wurde nun zweimal mit 350µl RW1-Buffer und zweimal mit 500µl RPE-Buffer gewaschen. Zwischen den beiden Waschvorgängen mit dem RW1-Buffer wurde noch ein DNase-Verdau mittels DNase I stock solution durchgeführt.

Nach den Waschvorgängen wurde das Spin Column in ein 1,5ml Collectingtube gesteckt. Die Membran der Spin Column wurde jetzt mit 40µl RNase free water benetzt, 5min bei Raumtemperatur inkubiert und für 1min. bei 10.000 U/min

zentrifugiert, um die RNA aus der Membran zu lösen. Die so gewonnene RNA wurde anschließend direkt weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C aufbewahrt.

### 3.5.4 Reverse Transkription

Die reverse Transkription ist der Schritt, bei dem aus der als Matrize dienenden RNA, mittels reverse Transkriptase, cDNA synthetisiert wird.

Die aus den Chondrozyten isolierte RNA wurde stets auf Eis gelagert, um die Zerstörung durch RNase möglichst gering zu halten.

Es wurden 3 µl der frisch isolierten RNA in ein Eppendorf-cap pipettiert. Anschließend wurde die RNA im Thermocycler nach folgendem Programm (Tabelle 3) denaturiert, um die RNA möglichst vollständig zu entspiralisieren.

**Tabelle 3: Denaturierung der RNA**

Vorgang	Temperatur	Zeitdauer
Step 1	18 °C	1 min
Step 2	70 °C	10 min
Step 3	4 °C	Hold

Im Anschluss an das Denaturieren wurde der Probe der Mastermix zugesetzt. Der Mastermix ist eine Lösung, die alle notwendigen Reagenzien enthält, die für die Synthese der cDNA benötigt werden. Dann wurde die Probe mit RNase-free H<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt. Im Einzelnen besteht der Mastermix aus den in Tabelle 4 aufgeführten Reagenzien.

**Tabelle 4: Zusammensetzung des Mastermix pro Probe**

<b>Reagenzien</b>	<b>Endkonzentration (in 20µl)</b>
MgCl <sub>2</sub> (5mM)	4,0µl
10 x Puffer-II ohne MgCl <sub>2</sub>	2,0µl
dNTP (1mM)	1,0µl
Random Hexamer Primer (2,5U/µl)	1,0µl
RNase-Inhibitor (1U/µl)	0,5µl
Reverse Transkriptase (2,5U/µl)	1,0µl
RNase freies H <sub>2</sub> O	11,5µl
<b>Gesamt</b>	<b>20,0µl</b>

Aus den denaturierten Proben mit dem entsprechenden Volumen an Mastermix, wurde nun mittels Thermocycler, cDNA synthetisiert. Das verwendete Programm ist in Tabelle 5 angezeigt.

**Tabelle 5: Reverse Transkription**

<b>Vorgang</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeitdauer</b>
Denaturierung (Initial)	20 °C	10 min
Amplifikation	43 °C	1h 15 min
Hold	99 °C	5 min

Nach Beendigung der cDNA Synthese wurden die Proben entweder sofort weiterverarbeitet oder, für maximal drei Tage, bei -20 °C eingefroren.

Um den Erfolg des cDNA-Syntheseschrittes später kontrollieren zu können, wurde für jede Probe eine negativ Kontrolle durchgeführt. Diese enthielt ebenfalls 3µl RNA und ein entsprechendes Volumen an Mastermix, bei dem jedoch das Volumen an reverse Transkriptase durch RNase-free H<sub>2</sub>O ersetzt wurde.

### **3.5.5 Qualitative PCR**

Zunächst wurde die cDNA auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 4µl cDNA pro Probe in ein Eppendorf-cap transferiert. Danach wurde der Mastermix (Tabelle 6),

der alle notwendigen Reagenzien für die PCR enthält, dazupipettiert und mit RNase-free H<sub>2</sub>O auf 50µl aufgefüllt. Als Referenz-Gen zum Cbfa1 wurde das *Housekeeping*-Gen HPRT gewählt. D.h., man erhielt pro cDNA Probe vier verschiedene Ansätze für die PCR. Einen Ansatz mit den beiden Primern für das Cbfa1 (Tabelle 8), einen Ansatz mit den beiden Primern für das HPRT (Tabelle 8) und die negativ Kontrollen (welche bei der cDNA-Synthese keine reverse Transkriptase zugesetzt bekamen) für Cbfa1 und HPRT.

**Tabelle 6: Zusammensetzung des Mastermix pro Probe**

Reagenzien	Endkonzentration (in 50µl)
3'-Primer (20pmol/µl)	1,0µl
5'-Primer (20pmol/µl)	1,0µl
10 x Puffer mit MgCl <sub>2</sub> (5mM)	4,0µl
dNTP (1mM)	0,5µl
Taq-Polymerase (Ampli-Taq 5U/µl)	0,3µl
RNase freies H <sub>2</sub> O	43,2µl
<b>Gesamt</b>	<b>50,0µl</b>

Die PCR wurde mit den Proben und den Negativ-Kontrollen im Thermocycler nach dem Programm (Tabelle 7) vollzogen.

**Tabelle 7: Polymerase Ketten Reaktion**

Vorgang	Temperatur	Zeitdauer	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95°C	6 min	1x
Denaturierung	95°C	20 s	55x
Annealing	61°C	30 s	
Extension	73°C	30 s	
Extension	73°C	7 min	1x



Nach Beendigung der PCR wurden Proben auf ein Agarose-Gel aufgetragen, um das amplifizierte PCR-Produkt mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid sichtbar zu machen.

**Tabelle 8: Nuklotidsequenz der eingesetzten Primer**

<b>Primersequenzen:</b>	
Cbfa1	fw: 5'-GGG AGG ATT TGT GAA GAC GGT-3'
	rw: 5'-CGA TCT GAG ATT TGT GGG CC-3'
HPRT	fw: 5'-AGG AAA GCA AAG TCT GCA TTG TT-3'
	rw: 5'-GGT GGA GAT GAT CTC TCA ACT TTA A-3'

### 3.6 Quantitative Real-Time-PCR

#### 3.6.1 Grundlagen

Eine wichtige Grundlage für die Auswertung der Daten in dieser Arbeit, war die Entwicklung der quantitativen Real-Time-PCR (qrt-PCR) (Heid et al, 1996). Mit dieser Methode ist es möglich, quantitative messbare Ergebnisse unserer Templatemenge zu erzielen. Heutzutage gilt die qrt-PCR zu den Standardmethoden zur quantitativen Bestimmung von Nukleinsäuren (Orlando et al, 1998; Giulietti et al, 2001; Overbergh et al, 2003).

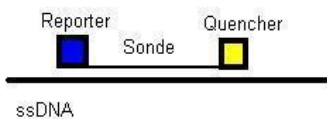
Bei den einzelnen Proben unserer Versuchsreihe, handelte es sich um kleine Mengen isolierter mRNA, welche vor der Messung noch in cDNA überführt werden musste. Auch hier wurde, analog zur qualitativen PCR, gezielt die zu amplifizierende Sequenz gewählt.

Die qrt-PCR bietet ein einfaches Verfahren, welches es ermöglicht, die Nukleinsäuren während der gesamten Reaktion zu messen. Die Methodik ermöglicht anhand von messbaren Fluoreszenzveränderungen, auf eine Veränderung des Reaktionsproduktes zu schließen (Higuchi et al, 1993; Fink et al, 2002).

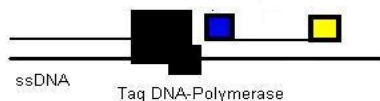
Eines der möglichen Real-Time Verfahren ist die Hydrolysesonde, welche in unserer Arbeit auch verwendet wurde. Die Hydrolysesonde besteht aus einer zur Zielsequenz komplementären Basensequenz, einem Quencherfarbstoff am 3'-terminalen Ende, dem sogenannten TAMRA (6-Carboxy-tetramethyl-rodamin) und einem

Reporterfarbstoff am 5'-terminalen Ende, dem sogenannten 6-FAM (6-Carboxy-Fluoreszein) (Holland et al, 1991; Gibson et al, 1996; Wilhelm et al, 2003), welche den übrigen, zur PCR üblichen, Reagenzien zugefügt werden. Des Weiteren, wurden ein spezifischer Vorwärts- sowie Rückwärts-Primer für die zu amplifizierende Sequenz beigemischt. Das Licht eines Argon-Laser mit der Wellenlänge 488nm diente zur Anregung. Die Fluoreszenz wird durch die räumliche Nähe des Quenchers und Reporter durch einen als Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer bezeichneten Vorgang, oder durch den Dexter-Mechanismus von dem Reporter auf den Quencher gelöscht (Bustin et al, 2000; Wilhelm et al, 2003).

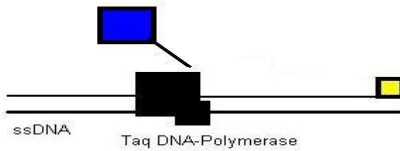
Die Sonde bindet während der Annealing-Phase an die innerhalb der DNA gelegene komplementäre Sequenz, die von den entsprechenden Primerbindungsstellen eingegrenzt wird (siehe Abbildung 7). Mittels Taq-Polymerase werden die Primer solange verlängert, bis sie die Sonde erreichen (siehe Abbildung 8). An dieser Stelle wird die Sonde von der DNA abgesichert. Die 5'-Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert nun die Sonde. Bei diesem Vorgang werden der Reporterfarbstoff der Sonde und der Quencher räumlich voneinander entfernt, der Quench fällt aus und das emittierte fluoreszierende Licht kann gemessen werden (siehe Abbildung 9) (modifiziert nach Wilhelm et al, 2003). Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz ist proportional zur amplifizierten Menge des PCR Produktes.



**Abbildung 7**



**Abbildung 8**



**Abbildung 9**

Als weiteren Vorteil dieser Methode ist zu nennen, daß die Kontaminationsrate im Gegensatz zur konventionellen PCR-Methodik wesentlich geringer ist, da ein häufiges öffnen und wieder schließen der Tubes entfällt.

### 3.6.2 Berechnung

Da die Amplifikationseffizienz in der exponentiellen Phase der PCR näherungsweise konstant ist, wird dies zur Berechnung der Messergebnisse genutzt. Ist die Messung beendet, wird die Kurve logarithmiert und ein geeigneter Punkt als Schwellenwert CT gewählt. Dieser Schwellenwert CT ist dem Logarithmus der Templatemenge proportional.

$$CT \propto \log(N_0)$$

Die Berechnung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode (Livak et al, 2001).

$T_0$  : (0) Nativ Probe

$T_n$  : Probe zum Zeitpunkt n

$CT_{0,T}$  :CT-Wert von Cbfa1 zum Zeitpunkt 0

$CT_{0,R}$  :CT-Wert von HPRT zum Zeitpunkt 0

$CT_{n,T}$  :CT-Wert von Cbfa1 zum Zeitpunkt n

$CT_{n,R}$  :CT-Wert von HPRT zum Zeitpunkt n

Der  $\Delta CT$ -Wert beschreibt das Verhältnis der logarithmierten Templatemengen des Test- und Referenzgens:

$$\Delta CT(T_0) = CT_{0,T} - CT_{0,R}$$

$$\Delta CT(T_n) = CT_{n,T} - CT_{n,R}$$

$\Delta\Delta CT$ -Wert: das auf den Kontrollwert ( $T_0$ ) normalisierte Verhältnis:

$$\Delta\Delta CT(T_n) = \Delta CT(T_n) - \Delta CT(T_0)$$

Die relative Veränderung der normalisierten Templatemenge des Testgens ergibt sich durch die Potenzierung des  $\Delta\Delta CT$ -Werts zur Amplifikationseffizienz als Basis, die üblicherweise mit 2 ( $\cong 100\%$ ) angenähert wird:

$$\xi = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

### 3.6.3 Reaktionsbedingungen

Die quantitative Real-Time-PCR wurde mit folgendem Ansatz (Tabelle 9) unter Standard Reaktionsbedingungen durchgeführt:

**Tabelle 9: Ansatz der Real-Time-PCR**

Reagenzien	Endkonzentration (in 50 $\mu$ l)
Template-cDNA	3,0 $\mu$ l
3'-Primer (950 $\mu$ M)	4,5 $\mu$ l
5'-Primer (950 $\mu$ M)	4,5 $\mu$ l
Hydrolysesonde	1,0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	12,0 $\mu$ l
2 x qPCR™ Puffer	25,0 $\mu$ l
<b>Gesamt</b>	<b>50,0<math>\mu</math>l</b>

Der Reaktionspuffer qPCR™ (2 x Reaktionspuffer, Eurogentec) enthält folgende Reagenzien:

- dNTP (1mM)
- Hot Goldstar DNA Polymerase
- MgCl<sub>2</sub> (5mM)
- Uracil-N-Glykosidase

Die folgenden Tabellen geben die Sequenzen der Primer (Tabelle 11) sowie der Hydrolysesonden an (Tabelle 10):

**Tabelle 10**

<b>Sequenzen der Hydrolysesonden:</b>	
Cbfa1-Taq-Man	5'FAM-TGA-AAC-TCT-TGC-CTC-GTC-CAC-TCC-G-TAMRA3'
HPRT-Taq-Man	5'FAM-CCA-GTG-TCA-ATT-ATA-TCT-TCC-ACA-ATC-AAG-AC-TAMRA3'

**Tabelle 11**

<b>Primersequenzen:</b>	
Cbfa1	fw: 5'-GGG-AGG-ATT-TGT-GAA-GAC-GGT-3' rw: 5'-CGA-TCT-GAG-ATT-TGT-GGG-CC-3
HPRT	fw: 5'-AGG-AAA-GCA-AAG-TCT-GCA-TTG-TT-3' rw: 5'-GGT-GGA-GAT-CTC-TCA-ACT-TTA-A-3'

Die quantitative PCR wurde nach dem Programm in Tabelle 12 durchgeführt.

**Tabelle 12**

<b>Vorgang</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeitdauer</b>	<b>Anzahl der Zyklen</b>
Denaturierung (Initial)	50 °C	2 min	1x
	95 °C	6 min	
Amplifikation	95 °C	20 s	45 x
	59 °C	30 s	
	73 °C	30 s	
Hold	25 °C	-----	-----

### **3.7 Elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA**

#### **3.7.1 Prinzip der Agarose-Gel-Elektrophorese**

Mit dem Verfahren der Gelelektrophorese lassen sich verschiedene Substanzgemische im elektrischen Feld (Gleichstrom) analytisch trennen. Aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen wandern DNA-Fragmente im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente hängt dabei von der Größe und der Form der Moleküle, sowie der angelegten Spannung und der Porengröße des Gels (Trägereigenschaft) ab. Kleinere Moleküle wandern aufgrund ihrer freieren Beweglichkeit weiter als größere Moleküle.

#### **3.7.2 Agarose-Gel-Elektrophorese**

Für die elektrophoretische Auftrennung der zu untersuchenden DNA-Proben wurde 2%ige Agarosegele hergestellt. Hierzu wurde 1g Agarose in 50ml TBE-Puffer durch Kochen gelöst. Die Lösung wurde mit 1,5µl Ethidiumbromid versetzt und bei Raumtemperatur abgekühlt. Das noch flüssige Gel wurde dann in die Gelkammer gegossen. Für die Geltaschen wurden Kämme mit 20 Zähnen verwendet. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde der Kamm entfernt und die Gelkammer mit TBE-Puffer aufgefüllt, bis Gel und Elektroden vollständig bedeckt waren. Das PCR-Produkt wurde mit 7,5µl Ladepuffer versetzt, vorsichtig homogenisiert und in jede Geltasche 7,5µl pipettiert. Als Molekulargewichtsmarker wurde ein Marker (  $\Phi$ X174 DNA/ *HINF* I) gewählt, der ein Spektrum von 20 DNA-Fragmenten in der Größe von 24-726bp abdeckt. Die Elektrophorese wurde bei 120V und 300mA solange laufen gelassen, bis die DNA-Fragmente etwa  $\frac{2}{3}$  des Gels passiert hatten.

Dokumentiert wurde das Ergebnis photographisch. Hierzu wurde das Gel von unten mit ultravioletterem Licht durchleuchtet und mit einer Polaroid Kamera photographiert (Film Polaplan; Blende 11; Belichtungszeit 2\*1/8 sek.).

### **3.8 Statistik**

Die gemessenen Daten wurden mit Hilfe eines Statistikprogramms verglichen, um zu ermitteln, ob signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Messzeitpunkten und qualitativ Unterschiedlichen Kulturen bestehen. Hierfür wurde das Programm SPSS für Windows (Release 10.0.5) verwendet.

Die Daten wurden mittels einer einfaktoriellen ANOVA-Analyse bearbeitet. Um die Frage nach signifikanten Unterschieden zu erarbeiten, wurden von jeder Passage der gesunden und jeder Passage der arthrotischen Chondrozyten die verschiedenen Messzeitpunkte untereinander mit einem Mehrfach-Test verglichen. D. h., es wurden beispielsweise bei Passage 0 die Messergebnisse von Tag 0 und Tag 14 miteinander verglichen, die Messergebnisse von Tag 0 und Tag 28, sowie die Messergebnisse von Tag 14 und Tag 28.

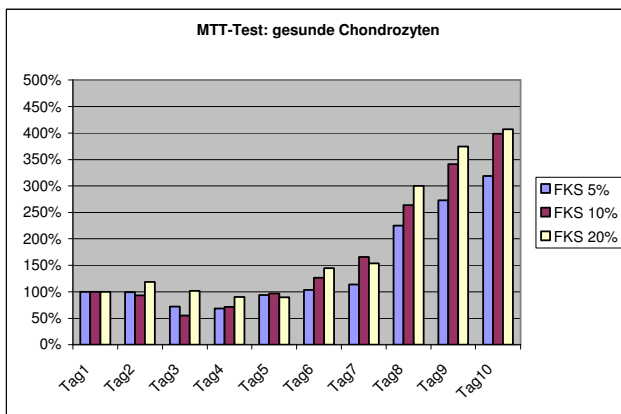
Um signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Messzeitpunkten der qualitativ Unterschiedlichen Kulturen zu berechnen, wurden diese ebenfalls mittels einer einfaktoriellen ANOVA-Analyse untersucht. Hier wurde bei jeder Passage am Messzeitpunkt Tag 14 und Tag 28 zwischen gesunder und arthrotischer Kultur unterschieden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Wachstumskurven

Zu Beginn der Studie wurden Wachstumstests durchgeführt, um den Einfluss der FKS-Konzentration auf die Zellproliferation von gesunden Chondrozyten, sowie von arthrotischen Chondrozyten zu ermitteln. Es wurden Kulturen mit FKS-Konzentrationen von 5%, 10% und 20% angelegt.

Hierfür wurde eine Versuchsreihe gestartet, in der Zellen einer Zelllinie mit gesunden Chondrozyten und Zellen einer Zelllinie mit arthrotischen Chondrozyten in einer Monolayerkultur über einen Zeitraum von zehn Tagen beobachtet wurde. An jedem Tag der Versuchsreihe wurde die Proliferation mittels MTT-Test gemessen. Die Ergebnisse für beide Versuchsreihen sind in den folgenden Diagrammen dargestellt. Kultiviert wurden die Zellen mit dem Medium Ham's F12K + entsprechender FKS-Konzentration bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.



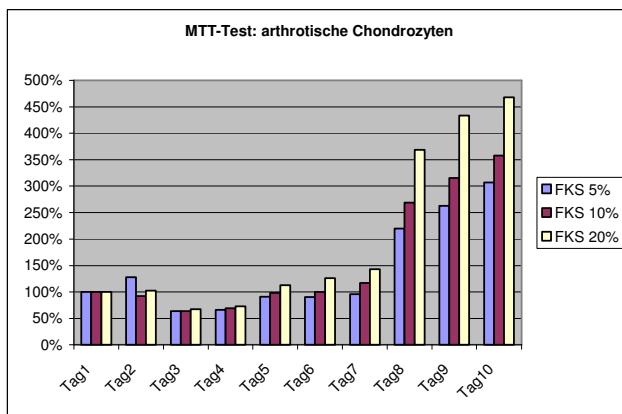
**Diagramm 1: Wachstumstest gesunder Chondrozyten über 10 Tage in einer Monolayerkultur mit verschiedenen Konzentrationen an FKS**

In beiden Diagrammen (Diagramm 1 und 2) ist auf der x-Achse die Dauer der Proliferationsversuche in Tagen aufgetragen. Auf der y-Achse ist der Anstieg der Zellzahl in Prozent aufgetragen, ausgehend von 100% am ersten Tag. Die



verschiedenen Farben repräsentieren die unterschiedliche FKS-Konzentration, die man in der Legende ablesen kann.

Der Wachstumstest für gesunde Chondrozyten (Diagramm 1) zeigte bei allen FKS-Konzentrationen eine Proliferation der Chondrozyten. In den ersten fünf Tagen konnte man bei keiner der Konzentrationen einen proliferativen Effekt auf das Wachstum der Chondrozyten erkennen. Ab dem sechsten Tag zeigte sich dann ein deutlich größerer Effekt bei den Zellen. Die Zellen, die im Medium nur einen Anteil von 5% FKS zur Verfügung hatten, zeigten eine Vermehrung von 100% auf 318,82%, Zellen die 10% FKS zur Verfügung hatten, einen Anstieg auf 398,39% und die Zellen, deren Medium zu 20% aus FKS bestand, einen Anstieg auf 406,61%.



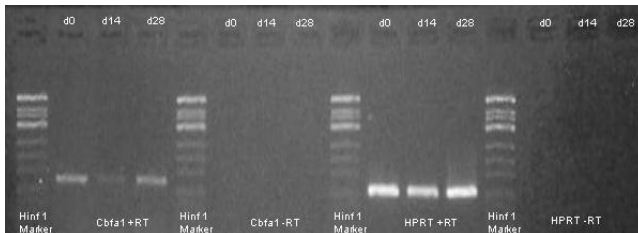
**Diagramm 2: Wachstumstest arthrotischer Chondrozyten über 10 Tage in einer Monolayerkultur mit verschiedenen Konzentrationen an FKS**

Ebenfalls deutlich, war der Effekt bei den arthrotischen Chondrozyten (Diagramm 2). Auch hier war erst ab dem sechsten Tag eine Proliferation zu erkennen. Die Verteilung ähnelt stark den Ergebnissen der Wachstumskurve für gesunden Chondrozyten. Bei 5% FKS-Anteil im Medium stieg der Wert von 100% auf 307,05%. Bei 10% FKS-Anteil wurden 357,98% erreicht und mit einem FKS-Anteil von 20%, stieg der Wert auf 467,54%.

Insgesamt war der proliferative Effekt, sowohl bei den gesunden, als auch bei den arthrotischen Chondrozyten, bei einem FKS-Anteil von 20% im Medium am größten.

## 4.2 Ergebnisse der qualitative PCR

Im Folgenden ist beispielhaft eine Gelelektrophorese der primär durchgeführten qualitativen Polymerase-Kettenreaktionen dargestellt.



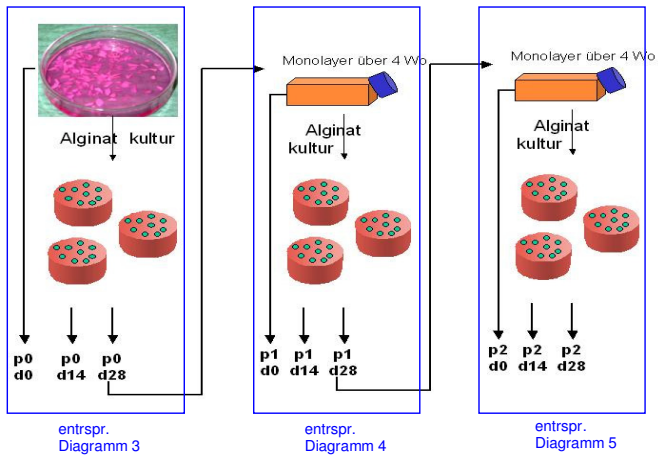
**Abbildung 10: Gelelektrophorese (qualitative PCR)**

Auf der Abbildung10 ist in Lane 1, 5, 9 und 13 der Molekulargewichtsmarker aufgetragen worden. Die Banden in Lane 2-4 stellen die Amplifikation des Cbfa1 Gens mit reverse Transkriptase dar. Lane 6-8 repräsentieren die Negativ-Kontrollen ohne reverse Transkriptase.

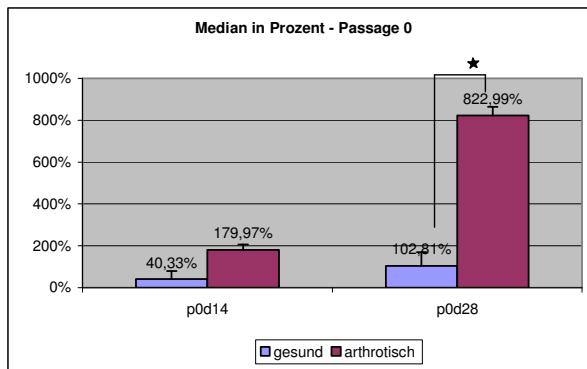
Die in Lane 10-12 sichtbaren Banden repräsentieren die Kontrolle mit dem Housekeeping Gen HPRT mit eingesetzter reverse Transkriptase. Entsprechend sind in Lane 14-16 die Negativ-Kontrollen für die Amplifikation mit dem Kontroll-Gen HPRT dargestellt.

## 4.3 Cbfa1 Expression

Der Ausgangswert der Cbfa1 Konzentration zu Beginn der Passage 0 (p0d0), zu Beginn der Passage 1 (p1d0) und zu Beginn der Passage 2 (p2d0) wurde jeweils auf 100% gesetzt, da die Chondrozyten zwischen den Passagen über vier Wochen in einer Monolayerkultur bebrütet wurden. Zur Erläuterung des Versuchsaufbaus, sei hier nochmals, das bereits im Material und Methodenteil aufgeführte Kulturschema (vgl. Abbildung 6), in modifizierter Weise dargestellt:



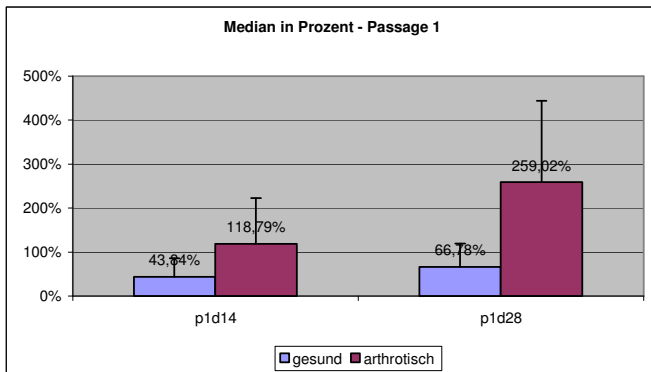
In den folgenden Diagrammen (Diagramm 3, 4 und 5) ist auf der x-Achse die Bezeichnung der Passage und des Entnahmetages aus der Kultur angegeben. Auf der y-Achse ist der Anstieg, beziehungsweise das Absinken der Cbfa1-Konzentration in Prozent aufgetragen, ausgehend von 100% am Tag 0. Die verschiedenen Farben repräsentieren die gesunden, beziehungsweise die arthrotischen Kulturen, wie in der Legende angegeben.



**Diagramm 3: Cbfa1 Expression der Chondrozyten in Passage 0**

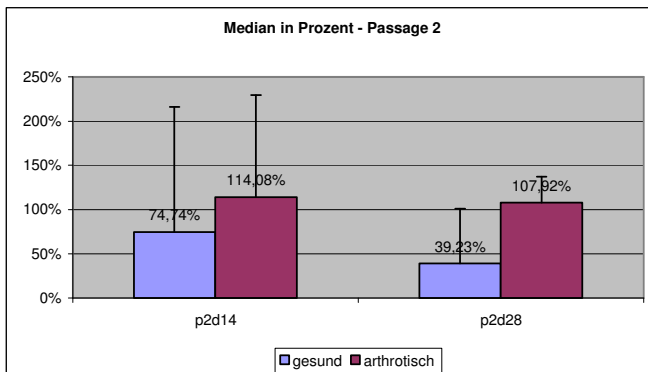
Im Verlauf der Kultivierung konnte man bei den gesunden Chondrozyten nach 14 Tagen eine Abnahme der Cbfa1 Konzentration auf 40,33% messen. Bei den

arthrotischen Chondrozyten hingegen stieg die Cbfa1 Konzentration auf 179,97%. Nach 28 Tagen Kultivierungsdauer näherte sich der Wert der gesunden Chondrozyten mit 102,81% wieder der Anfangskonzentration. Bei den arthrotischen Chondrozyten wurde mit 822,99% ein Anstieg auf nahezu das Achtfache gemessen, was einen signifikanten Unterschied bedeutet (Diagramm 3).



**Diagramm 4: Cbfa1 Expression der Chondrozyten in Passage 1**

Zu Beginn der Passage 1 (Diagramm 4) wurde der Ausgangswert wieder auf 100% gesetzt. Ähnlich wie in Passage 0 konnte man auch in dieser Passage nach 14 Tagen bei den gesunden Chondrozyten ein Absinken der Konzentration auf 43,84%, bei den arthrotischen Chondrozyten einen Anstieg auf 118,79% messen. Nach 28 Tagen stieg die Konzentration bei den gesunden wieder etwas an. Diesmal nur auf 66,78%, was ca.  $\frac{2}{3}$  der Anfangskonzentration entspricht. Bei den arthrotischen Chondrozyten war der Anstieg auf 259,02% diesmal deutlich geringer.



**Diagramm 5: Cbfa1 Expression der Chondrozyten in Passage 2**

In Passage 2 ließ sich bei den gesunden Chondrozyten nach 14 Tagen ein Abfall der Konzentration um ca.  $\frac{1}{4}$  auf 74,74% messen. Die Cbfa1 Konzentration bei den arthrotischen Chondrozyten blieb mit 114,08% fast unverändert. Besonders interessant ist der Rückgang der Cbfa1 Konzentration nach 28 Tagen. Hier wurden bei den gesunden nur noch 39,23% des Ausgangswertes gemessen und bei den arthrotischen blieb der Wert mit 107,92% nahezu unverändert.

Der statistische Signifikanz zwischen den einzelnen Qualitäten des Knorpels und der Kultivierungsdauer wurden mit einer einfaktoriellen ANOVA-Analyse (siehe Anhang) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde hierbei auf den Wert 0,05 festgelegt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Zellkultur

In vivo sind Chondrozyten in eine natürlich Matrix eingebettet und ein direkter Zell-Zellkontakt ist nicht vorhanden. Des Weiteren, sind im humanen adulten hyalinen Knorpel keine Blutgefäße vorhanden, die den Knorpel direkt mit Nährstoffen versorgen. Dies geschieht per diffusionem mittels Synovialflüssigkeit, da die Blutkapillaren bereits im Perichondrium enden. Trotz dieser Situation in vivo, lassen sich Untersuchungen an humanen Gelenkchondrozyten in vitro durchführen, wobei jedoch einige Besonderheiten zu beachten sind.

Eine zweidimensionale Kultur, zum Beispiel eine Monolayer-Kulturflasche aus Plastik, ermöglicht Untersuchungen ohne die Einflüsse der natürlichen Matrix und der mechanischen Belastungen. Der Vorteil der zweidimensionalen Monolayerkulturen liegt zum einen in der relativ schnellen Proliferation der Chondrozyten, sowie in der wenig aufwendigen Handhabung. In vivo ist die Proliferationsrate von Chondrozyten im Vergleich deutlich geringer (Aydelotte et al, 1992). Adhärente Zellen werden, sobald sie konfluent die Wachstumsfläche bedecken, durch Trypsinieren von der Auflagefläche gelöst, und anschließend auf weitere Kulturflaschen verteilt. Diese Art der Vermehrung beinhaltet allerdings den Nachteil, daß der morphologische und biochemische Erhalt des Phänotyps nicht möglich ist. Das ursprünglich runde Aussehen der Chondrozyten geht verloren und die Zellen nehmen eine spindelförmige, fibroblastoide Form an, was als *shift* der phänotypischen Differenzierung bezeichnet wird. Dieser *shift* beginnt schon nach wenigen Tagen. Die Zellen fangen an kleinere Proteoglykane, Kollagen I, III, V oder Versican zu produzieren, die man normalerweise in Fibroblasten oder Frühformen der Chondrozyten (Prächondrozyten) findet (Aulthouse et al, 1989; Archer et al, 1990; Kania et al, 1990; von der Mark and Conrad 1979).

Ist es Ziel, Chondrozyten zu kultivieren, die einen differenzierten Phänotyp besitzen, muss das Phänomen der Dedifferenzierung durch andere Kultivierungsmethoden umgangen werden.

Eine Methode um das Auftreten dieses Phänomens zu minimieren, ist das Alginat System. Dies ist ein dreidimensionales Kultursystem, welches aus einem linearen

Polysaccharid 1-4  $\beta$ -D-Mannuronsäure und  $\alpha$ -L-Guluronsäure besteht, und aus braunen Meeresalgen gewonnen wird.

Nach der enzymatischen Gewinnung der Chondrozyten, werden diese unmittelbar in eine 1,2%ige Alginatlösung überführt. Anschließend tropft man diese Alginat-Chondrozytensuspension in eine 102mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung. Dieser Tropfen polymerisiert unmittelbar nach dem Eintropfen aus und wird als sogenannter „Alginatbead“ bezeichnet. In diesen Alginatbeads können die Chondrozyten dreidimensional wachsen und stellen somit eine artifizielle Knorpelmatrix dar.

Häuselmann führte den ersten und wohl bekanntesten Versuch mit der Methode der Alginatkultivierung durch. Ihm gelang es in einer dreidimensionalen Alginatkultur, mit humanen und bovinen artikulären Chondrozyten, über einen Zeitraum von mehr als einem halben Jahr, phänotypische Indikatoren nachzuweisen (Häuselmann et al, 1992; Häuselmann et al, 1994).

In dieser Arbeit haben wir uns beide Kultursystem zu Nutze gemacht, um die Cbfa1 Regulation in humanen gesunden und arthrotischen artikulären Chondrozyten zu untersuchen.

In dieser Studie wurden die Chondrozyten enzymatisch aus Knorpelgewebe gewonnen, in eine dreidimensionalen Alginatkultur gebracht und anschließend in einer zweidimensionalen Kultur wieder vermehrt, gemäß dem Versuchsaufbau in Abbildung 6.

Wir konnten zeigen, daß es wohl nicht nur bezüglich der bekannten Indikatoren, wie Proteoglykan und Kollagen Typ-I, sondern auch bei der Expression des Cbfa1 zu einer Regression in der dreidimensionalen Kultur kommt.

Der Ansatz ein zweidimensionales und ein dreidimensionales Kultursystem miteinander zu kombinieren schafft die Möglichkeit eine große Anzahl von differenzierten Chondrozyten in vitro zu züchten, wie sie beispielsweise für eine autologe Chondrozytentransplantation notwendig ist (Haudenschild et al, 2001).

Die bisher erzielten Ergebnisse des Tissue Engineering geben allerdings Anlass zur Diskussion, da man sich auf diesem Gebiet noch am Anfang der Forschung bewegt. Gezüchtete Chondrozyten und deren Transplantation erfüllen heute oft noch nicht die Erwartungen, die vom Patienten gestellt werden. Die Knorpeltransplantate die bereits zur Verfügung stehen, zeigen, soweit überhaupt schon näher untersucht, dass sie in biomechanischer Hinsicht nicht denen eines natürlichen hyalinen Knorpels genügen.

## 5.2 Degeneration und Regeneration von Chondrozyten

Eine Knorpeldegeneration wird vorwiegend im hyalinen Gelenkknorpel beobachtet, was weithin als Osteoarthritis bekannt ist. Die Druckelastizität und seine Zugelastizität in gewissen Grenzen, unter Beibehaltung seiner Flexibilität, sind kennzeichnende Eigenschaften (Junqueira et al, 1996). Artikulärer Knorpel scheint besonders anfällig zu sein für Degeneration, da regenerative Prozesse, wie sie in anderen Organen, zum Beispiel der Leber, fehlen. Die Tatsache, dass Unregelmäßigkeiten oder Störungen in der normalen Gelenkfunktion die Entstehung der Osteoarthritis beschleunigen, untermauern diese Hypothese. Beispielsweise schützt ein intakter Meniskus, durch Gewichts- und Druckverteilung die Knorpeloberfläche. Wird durch eine partielle oder totale Meniskusresektion dieser „Puffer“ entfernt, kommt es zu einer höheren Belastung des Oberflächenknorpels, welcher für diese Leistung nicht ausgelegt ist. Die Matrix wird folglich übermäßig komprimiert und es resultiert, infolge der schlechten Diffusion, eine insuffiziente Nährstoffversorgung. Dadurch geht der Knorpel zugrunde, was sich zum Beispiel durch Abhebung der Knorpeloberfläche zeigt (Kurz et al, 2001). Offenbar kommt es unter diesen Bedingungen auch zu einem Anstieg der Cbfa1 Expression.

Typischerweise formieren sich die Chondrozyten in unmittelbarer Umgebung zu diesen überbeanspruchten Arealen in sogenannten Zellnestern oder Clustern (Battmann et al, 2003). Normalerweise liegen Knorpelzellen bevorzugt einzeln oder in kleinen geradzahligen Gruppen in sogenannten Chondronen (Knorpelhöhlen). Die Zellgruppen entstehen durch Mitose einer Knorpelzelle. Aus diesem Grund werden sie als isogene Gruppen bezeichnet. Innerhalb einer solchen Gruppe kann man den Reifegrad einzelner Chondrozyten aufgrund ihres Aussehens differenzieren. Umgeben werden die Chondrone von Knorpelgrundsubstanz (Matrix) (Junqueira et al, 1996). Die Clusterformation ist lediglich als eine vergebliche Bemühung der Knorpelregeneration zu sehen. Gelenkchondrozyten scheinen also Zellen zu sein, die lediglich eine gewisse Lebensdauer besitzen. Sie folgen einem festgelegten Differenzierungsweg. Von der Stammzelle ausgehend, ändern sie ihr morphologisches Erscheinungsbild zum Chondroblasten (engl.: proliferating chondroblast), dessen Hauptaufgabe die mitotische Teilung ist, um einen suffizienten Pool an Matrix produzierenden Zellen zu bilden. Anschließend entwickelt sich dann der Chondroblast zum sogenannten matrixproduzierenden Chondroblasten (engl.:



producing chondroblast), der die Matrix des die Gelenkoberfläche überziehenden Knorpels bildet. Letztlich wird der Chondroblast zum typisch bizellulär erscheinenden Chondrozyten.

Eine Regeneration aus einem Stammzellpool, wie es in anderen Organen bekannt ist, scheint offenbar nicht vorgesehen. Allerdings lassen sich im entstehenden Kallusgewebe, bei frischen Knochenbrüchen, typische Knorpelzellen nachweisen. Dies deutet darauf hin, dass sich im Knochengewebe stets induzierbare Stammzellen befinden. Nach der vollständigen Knochenheilung allerdings, verschwinden diese Zellen wieder vollständig (Battmann et al, 2003).

Eine vollständige Knorpelregeneration „ad integrum“ ist bis heute nicht beschrieben. Entstandene Defekte werden im Organismus mit einem minderwertigen Mischgewebe aus fibrotischem Narbengewebe und einem Gewebe mit kartilaginären Eigenschaften, welches beispielsweise knorpelspezifische Kollagene produziert, gedeckt (Tew et al, 2001). Bezüglich morphologischer Kriterien, scheitern die fortschrittlichen Methoden des Tissue Engineering und des Knorpelersatzes im Allgemeinen an der Hürde, einen typisch hyalinen Knorpel herzustellen, der seine Eigenschaften beibehält. Deshalb sollte immer noch von einer Defektheilung gesprochen werden.

Ein Ansatz zum Erhalt der typischen Knorpel Eigenschaften, scheint die Wahl des Kultursystems zu sein. Die heutzutage in vitro gezüchteten Chondrozyten sind eine der wichtigsten Voraussetzungen für das moderne Tissue Engineering und die Knorpeltherapie. Pionier auf diesem Gebiet war Peterson. Er kultivierte Chondrozyten in vitro zunächst in zweidimensionalen Monolayerkulturen, um sie dann, nach der schon weiter oben erwähnten Vermehrung, als autologe Chondrozytentransplantate zu reimplantieren (Peterson et al, 2000). Eine näher an der Zellbiologie liegende Methode ist die dreidimensionale Kultur auf Alginatbasis (Schulze et al, 2000; Jubel et al, 2002), welche in dieser Studie deutlichen Einfluss auf die Ergebnisse hatte.

Die Differenzierung von Chondrozyten lässt sich nicht zweifelsfrei nach morphologischen Kriterien bestimmen. Hierfür sind der Nachweis bestimmter Proteine, wie beispielsweise Kollagen Typ-2, 9, oder 11 notwendig. Auf der anderen Seite lässt das identifizieren von Kollagen Typ-1, 3 oder 10 auf eine Dedifferenzierung schließen. Eine Identifikation dieser Proteine erfolgt in der Regel mit speziellen Assays oder mit immunhistochemischen Methoden. Jüngere Verfahren, wie die

Polymerase Kettenreaktion, die auch in dieser Arbeit angewendet wurde, erlauben die Bestimmung von zusätzlichen Faktoren auf Basis der mRNA Expression. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass es die Messung von Faktoren ermöglicht, welche nicht mit der direkten Sekretion spezieller Proteine oder anderen Produkten gekoppelt ist. Einer dieser Faktoren ist das Cbfa1 (Core binding factor), das auch als PebP2αA (Polyomavirus enhancer binding protein 2) bekannt ist. Cbfa1 ist ein Transkriptionsfaktor der sogenannten *runt superfamily*. Der Begriff *runt* bedeutet, dass die α Untereinheit des Cbf strukturell homolog zu dem Produkt des *Drosophila* Gens *runt* ist. Es enthält einen Abschnitt, den man als *Runt domain* bezeichnet. Diese Domäne wird zur DNA Bindung und zur Dimerisation mit der β Untereinheit benötigt.

Cbfa1 wurde erstmals in osteoblastären Zelllinien entdeckt. Erst später identifizierte man es auch in kartilaginären Zellen. Es scheint also nicht nur bei der Osteogenese einen kontrollierenden Einfluss zu haben, sondern auch bei der Differenzierung von Chondrozyten von Bedeutung zu sein.

In dieser Studie wurde die Expression des Cbfa1 in humanen gesunden und arthrotischen Gelenkchondrozyten untersucht, um Aufschluss über die kontrollierende Funktion dieses Transkriptionsfaktors bei der Chondrozytenhypertrophie zu bekommen. Hypertrophe Chondrozyten nehmen, als eine unabdingbare Stufe zwischen dem kartilaginärem Gerüst und echtem Knochen, eine zentrale Rolle ein.

In der Phase der enchondrale Ossifikation übernehmen Chondrozyten eine entscheidende Funktion. Hier wird vor der eigentlichen Knochenbildung ein Knorpelskelett angelegt. Undifferenzierte Stammzellen gruppieren sich zusammen und differenzieren zu Chondrozyten, die knorpelspezifische Proteine synthetisieren und von extrazellulärer Matrix umgeben werden. Ist dies abgeschlossen, beginnen die Chondrozyten zu hypertrophieren (Junqueira et al, 1996). Während der frühen Skelettentwicklung wird Cbfa1 von sich zum Knorpelgerüst gruppierenden mesenchymalen Zellen in hohem Maße exprimiert (Ducy et al, 1997). Da Cbfa1 auch für die spätere Knochenentwicklung von Nöten ist, wird weiterhin osteoblastenspezifisches Cbfa1 exprimiert, jedoch in geringerem Maße, als bei der frühen Knochenentwicklung (Komori et al, 1997; Otto et al, 1997; Inada et al, 1999; Kim et al, 1999). Diese basale Expression entspricht der Ausgangskonzentration des Cbfa1 der von uns untersuchten gesunden Chondrozyten.

Die Annahme, daß Cbfa1 eine regulierende Funktion bei der Hypertrophie der Chondrozyten haben könnte, wurde durch Studien mit Cbfa1 knock-out Mäusen gestärkt (Inada et al, 1999; Kim et al, 1999).

Der zu Beginn unserer Untersuchung gemessene Cbfa1 Level, wurde sowohl bei den gesunden, als auch bei den arthrotischen Chondrozyten mit 100% angenommen. Im Verlauf der Passage 0 ließ sich bei den gesunden Chondrozyten eine Abnahme der Cbfa1 Konzentration messen, die sich aber zum 28 Tag wieder an den anfänglichen Cbfa1 Level anglich. Im den folgenden Passagen 1 und 2 konnten wir sogar eine Verminderung der Cbfa1 Expression bezüglich des Ausgangswertes verzeichnen. In Passage 1 bot sich ein ähnliches Bild wie in Passage 0. Auch hier kam es zu einer stärkeren Verminderung nach halber Passagezeit, die sich allerdings zum Ende hin nur auf ca. 2/3 der Anfangsexpression steigerte. In der letzten Passage war das Bild etwas verändert. Hier erreichten wir die stärkste Regression der Cbfa1 Expression am Ende der Passagezeit. Das läßt sich möglicherweise folgendermaßen erklären:

Die Chondrozyten werden bei der Explantation aus dem Organismus für kurze Zeit ihrer physiologischen Umgebung beraubt. Des Weiteren, sind bis zum Einbringen in die artifizielle dreidimensionale Matrix, einige Arbeitsschritte notwendig. Dies bedeutet, dass die Zellen einem gewissen Stress unterworfen sind. Diese unphysiologische Belastung könnte, analog den Entstehungsmechanismen der Osteoarthritis, der Grund für eine kurzfristige Hochregulation der Cbfa1 Expression sein. Nachdem die Knorpelzellen wieder in der für sie normalen räumlichen Struktur eingebettet sind, erholen sie sich schnell wieder und die im Verlauf beobachtete diskrete Absenkung der Cbfa1 Konzentration reflektiert lediglich die Erholung der Zellen auf das kurze Stressereignis.

Die Tatsache, dass sich die Expression des Cbfa1 während der gesamten Beobachtungsdauer um die Ausgangskonzentration bewegt, scheint darauf zu beruhen, dass die Chondrozyten nach der Phase der Skelettentwicklung zwar weiterhin Cbfa1 produzieren (Komori et al, 1997; Otto et al, 1997; Inada et al, 1999; Kim et al, 1999), sich aber bezüglich ihrer Differenzierungsstufe, auf dem Niveau der physiologischen Reife befinden. Sie scheinen in das Stadium des hypertrophen Chondrozyten eingetreten zu sein und erfüllen ihre Syntheseleistung, um den natürlichen gesunden hyalinen Knorpel zu erhalten. Diese Ergebnisse unterstreichen

die Annahme der regulierenden Funktion des Cbfa1 von Inada (Inada et al, 1999) und Kim (Kim et al, 1999).

Bei der Untersuchung der Chondrozyten, die aus arthrotischen Knorpelgewebe gewonnen wurden, verhielt sich die Cbfa1 Expression deutlich anders.

Während der ersten Passage kam es schon nach 14 Tagen zu einem Anstieg auf nahezu das Doppelte. Am Ende der Passage wurde ein signifikanter Anstieg auf das achtfache gemessen. Erstaunlich waren die Ergebnisse in den folgenden Passagen. Hier konnten wir im Verlauf einen Rückgang der anfangs hohen Cbfa1 Expression messen. In Passage 1 war die Expression nur noch knapp 2½-mal so hoch wie zu Beginn, und in Passage 2 konnten wir über die gesamte Passagezeit eine gleichbleibende Cbfa1 Expression dokumentieren.

Der während der ersten Passage signifikante Anstieg des Cbfa1, läßt sich nicht allein auf den kurzfristigen Stress bei der operativen Explantation und der Verarbeitung zurückführen. Hier scheinen weitere Faktoren eine Rolle zu spielen.

Offenbar induziert ein Ungleichgewicht zwischen physiologischer Syntheseleistung und normaler degenerativer Abnutzung des Knorpels, wie es bei der Entstehung der Osteoarthritis zugrunde liegt, eine vermehrte Expression des regulierenden Transkriptionsfaktors Cbfa1.

Der Anstieg in der ersten Passage könnte dadurch erklärt werden, dass die Chondrozyten bereits in vivo einem so starken Stress ausgesetzt waren, dass es zu einer massiven Hochregulation des Cbfa1 kam. Trotz der Überführung in eine für Chondrozyten, zwar artifizielle, aber annähernd physiologische Umgebung, wurde zunächst weiter ein hohes Maß an Cbfa1 exprimiert. Diese weiter ansteigende Expression des Cbfa1 ist als ein Überhang der vorherigen unphysiologischen Stressverhältnisse im Organismus zu interpretieren. Die Chondrozyten befanden sich solange in einer für sie nicht vorgesehenen Umgebung, daß sie eine Dedifferenzierung gemäß den ihnen gebotenen Verhältnissen durchgemacht haben.

In den folgenden Passagen regulierten die Chondrozyten die Expression des Cbfa1 herunter. Dieses Verhalten der Zellen könnte darauf beruhen, daß die Chondrozyten durch die Kultivierung in der dreidimensionalen Alginatmatrix, die einer physiologischen Matrix sehr ähnliche ist, eine Art Erholung bezüglich des Cbfa1 durchmachen. Offensichtlich sind Chondrozyten in der Lage auf eine Veränderung der sie umgebenden Matrix zu reagieren, und zwar nicht nur im Sinne einer Degeneration durch metabolischen oder mechanischen Stress (Fassbender et al,

1982; Niethard et al, 1997; Kurz et al, 2001), sondern auch auf eine Ihnen gebotene stressfreie Umgebung.

Am Ende der Beobachtungsdauer dieser Studie konnten wir sogar über den gesamten Verlauf der letzten Passage ein gleichbleibendes Expressionsniveau des *Cbfa1* messen. Dies impliziert eine Redifferenzierung der Zellen in Richtung des physiologischen artikulären Chondrozyten.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die dreidimensionale Alginatkultur nicht nur einen Einfluss auf den Erhalt der Differenzierung hat (Schulze et al, 2000; Jubel et al, 2002), sondern auch auf die Richtung des Chondrozyten entlang seines Entwicklungspfad.

### **5.3 Chondrogene Differenzierung und Dedifferenzierung**

Der Begriff Differenzierung beschreibt den physiologischen Entwicklungspfad einer Zelllinie, hier speziell den der Chondrozyten. Der physiologische Weg geht von der Stammzelle aus. Die Stammzelle entwickelt sich zum frühen Chondroblast (proliferating chondroblast), dessen Aufgabe die mitotische Zellteilung ist. Über die Stufe des matrixproduzierenden Chondroblast (producing/expanding chondroblast) entwickelt sich schließlich der artikuläre Chondrozyt. Wie schon erwähnt, zeichnet sich dieser „ausdifferenzierte“ Chondrozyt durch die Produktion spezifischer Proteine aus.

Das Wort Dedifferenzierung impliziert eine schrittweise Rückentwicklung der Zellen entgegengesetzt des physiologisch festgelegten Entwicklungspfad zu einem weniger hohen Reifestadium.

Wenn man sich die meisten anderen Gewebe betrachtet, kann man eine gewisse Anzahl noch vorhandener Stammzellen finden. Diese „Reservisten“ haben die Aufgabe, je nach Größe des Defekts, eine organisierte Gewebereparatur entlang der Differenzierungsachse vorzunehmen. Hier liegt also ein physiologisches Regenerationspotential aus einem Stammzellpool vor. Nicht so bei artikulärem Knorpelgewebe. Hier lässt sich kein Stammzellpool finden mit dem eine Geweberegeneration erzielt werden könnte. Folglich scheinen die Knorpelreparaturversuche von den Chondrozyten selbst initiiert zu werden. Eine diese Tatsachen unterstützende Hypothese ist das Konzept der Plastizität.

## 5.4 Plastizität

Unter dem Konzept der Plastizität versteht man, dass Zellen sich nicht zu einer niedrigeren Entwicklungsstufe dedifferenzieren, sondern einen Wechsel (switch) ihrer Differenzierung vollziehen, hin zu einem anderen Phänotyp (siehe Abbildung 11 – nach Battmann, 2003). Beispielsweise gehören Osteoblasten und Fibroblasten zum chondrozytären Phänotyp. Dies lässt sich durch Betrachtung der enchondralen Ossifikation oder bei Bildung von Kallusgewebe nach Knochenbrüchen veranschaulichen (Battmann et al, 2003).

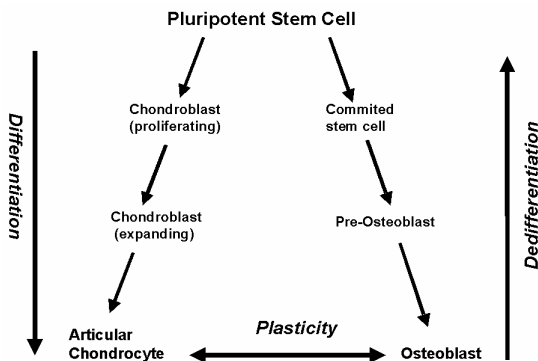


Abbildung 11

In dieser Arbeit konnten wir die Plastizität von Chondrozyten anhand der Expression des Cbfa1 demonstrieren. Dieser Transkriptionsfaktor gilt als unabdingbarer Differenzierungsmarker bei der osteoblastären Differenzierung (Ducy et al, 1997). Auf Grund dessen, gewann das Vorkommen dieses Faktors in Chondrozyten, in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung (Kim et al, 1999; Stricker et al, 2002). Knorpelzellen, die aus frischem gesundem humanem Gelenkknorpel gewonnen werden, zeigen ein basales Cbfa1 Expressionsniveau. Kultiviert man diese Zellen über einen gewissen Zeitraum in einer dreidimensionalen Kultur, lässt sich kein Anstieg der Cbfa1 Expression messen. Bei den frisch gewonnenen arthrotischen Chondrozyten lässt sich zu Beginn des Kultivierungszeitraumes ein Anstieg der Cbfa1 Konzentration feststellen, der im weiteren Verlauf wieder stark rückläufig ist. Die

Chondrozyten scheinen also ihren dedifferenzierten osteoiden Zustand zurück zum chondrozytären Phänotyp zu switchen.

Diese Ergebnisse lassen folgende wichtige Aussagen zu.

Zum einen, scheint die physiologisch dreidimensionale kollagene Umgebung der Chondrozyten einen unabdingbaren Einfluss auf den Erhalt des Phänotyps der Zellen zu haben. Folglich sollte in vitro kultivierten Chondrozyten die artifizielle dreidimensionale Alginatmatrix geboten werden, um ihre chondrogene Differenzierung zu erhalten, beziehungsweise diese wieder zu erlangen (Hauselmann et al, 1994, Chubinskaya et al, 2001, Reiter et al, 2002).

Zum anderen ist die Überlegung, dass Chondrozyten in einer unphysiologischen Umgebung dedifferenzieren, offenbar nicht ganz richtig. Vielmehr ändern sie ihre Differenzierung in Richtung eines eher osteoblastären Phänotyps. Überführt man sie in eine Umgebung, die der natürlichen weitgehend entspricht, vollziehen sie einen erneuten switch, zurück zu ihrem ursprüngliche chondroblastären Phänotyp, was kennzeichnend ist, für ein Verhalten nach dem Prinzip der Plastizität (Bahrami et al, 2000; Gerstenfeld et al, 2002; Hegert et al, 2002).

## **6 Zusammenfassung**

### **6.1 Zusammenfassung (deutsch)**

Einer der frühesten Marker und grundlegende Voraussetzung für eine osteoblastäre Zelldifferenzierung ist der Core binding factor  $\alpha 1$  (Cbfa1). Studien mit knock-out Mäusen konnten ebenfalls eine Rolle des Cbfa1 auf die Reifung von Chondrozyten und für die enchondrale Ossifikation zeigen. Dies lässt auf ein Differenzierungspotential von kartilaginären Zellen in osteoblastäre Zellen schließen. In dieser Studie wurde die Expression und Regulation von Cbfa1 in gesunden und arthrotischen humanen Gelenkchondrozyten in vitro in Abhängigkeit von Kulturdauer und dem Einfluss einer dreidimensionalen Zellanordnung in einer Alginatmatrix untersucht.

Die humanen Gelenkchondrozyten wurden aus Operationspräparaten isoliert. Die so gewonnenen Chondrozyten wurden mit DMEM/Ham's F12K Medium, 20% fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C kultiviert. Es wurden zweidimensionale und auf Alginat basierende dreidimensionale Kulturen angelegt. Aus diesen Ansätzen wurde in regelmäßigen Abständen die Expression des Cbfa1 mittels mRNA Extraktion und Amplifikation (PCR) untersucht. Die Bestimmung wurde nach Standardprotokollen (Qiagen) durchgeführt, eine quantitative Bestimmung erfolgte im Verhältnis zum Housekeeping Gen HPRT.

Bei unseren Untersuchungen konnte in arthrotischen humanen Chondrozytenkulturen, im Vergleich zu gesunden, eine unterschiedliche Cbfa1 Expression beobachtet werden. Bei den arthrotischen kam es anfänglich zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression, der im Verlauf der Beobachtungen, der in Alginat eingebrachte Zellen, rückläufig wurde, bis die Cbfa1 Expression schließlich wieder dem Anfangsniveau entsprach.

Die gesunden humanen Chondrozyten zeigten nur minimale Veränderung an. Die Werte für die Genexpression bewegten sich während der gesamten Untersuchung um die gemessene Anfangsexpression.

Die in dieser Studie beobachtete Regulation des Core binding factor  $\alpha 1$  (Cbfa1), könnte eine Erklärung des Krankheitsverlaufs bei degenerativen Arthrosen bieten. Die Umdifferenzierung (Plastizität) der Chondrozyten in Richtung eines mehr



osteoblastären Phänotyps kann möglicherweise die mangelnde Regeneration arthrotischen Knorpels erklären. Andererseits eröffnet die Redifferenzierung in der auf Alginate basierenden dreidimensionalen Chondrozytenkultur eine Möglichkeit der Erzeugung differenzierter Knorpelzelltransplantate auch aus bereits arthrotisch vorgeschädigtem Gewebe.

Die hier vorgestellten Ergebnisse bieten zum einen auf molekularer Ebene, eine mögliche Erklärung für die Pathologie der Arthrose, eröffnen aber auch zum anderen Optionen für mögliche Strategien zur Behebung bereits entstandener Schäden im Bereich des Gelenkknorpels.

## **6.2 Summary (english)**

One of the earliest markers and basic condition for an osteoblast cell differentiation is the core binding factor and  $\alpha 1$  (cbfa1). Studies with knock-out mice could show a role of cbfa1 at the maturation of chondrocytes and for enchondral ossification. This allows closing on a differentiation potential of cartilage cells into osteoblast cells. In this study the expression and regularization was examined by cbfa1 in healthy and arthrotic human articular chondrocytes in vitro as a function of cultural duration and the influence of a three-dimensional cell arrangement in an alginate matrix.

The human articular chondrocytes were isolated from operation preparations. The won chondrocytes were cultivated with DMEM/Ham's F12K medium, 20% fetal calf serum and 1% of penicillin/streptomycin in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> with 37 °C. It was put on two-dimensional and on alginate based three-dimensional cultures. From these attempts the expression of cbfa1 was examined at regular intervals by mRNA extraction and amplification (PCR). The regulation was determined to standard protocols (Qiagen), a quantitative regulation occurred in proportion to housekeeping gene HPRT.

With our analysis a different cbfa1 expression could be observed in arthrotic human articular chondrocytes in comparison to healthy ones. The arthrotic chondrocytes came at first to a significant increase of the genetic expression which became falling in the course of the observations, concerning the cells cultured in alginate, until the cbfa1 expression, in the end, again corresponded to the beginning level.

The healthy human chondrocytes indicated only minimum change. The values of the genetic expression moved during the whole investigation around the measured beginning expression.

The regularization observed in this study of the core binding factor  $\alpha$  1 (cbfa1), could offer an explanation of the illness course by osteoarthritis. The dedifferentiation (plasticity) of the chondrocytes in the direction of more osteoblastic phenotype can possibly explain the lacking regeneration of arthrotic cartilage. On the other hand, the redifferentiation opens a possibility for the production of differentiated cartilage cell grafts also from already arthrotic preinjured chondrocytes in the three-dimensional culture basing on alginate.

The presented results offer, on the one hand, at molecular level, a possible explanation of the pathology of the osteoarthritis, however, open also for the other option possible strategies to the removal already in this area damaged joint cartilage.

## 7 Literaturverzeichnis

Aigner T.; Kim H, A. (2002): Apoptosis and cellular vitality: issues in osteoarthritic cartilage degeneration, *Arthritis Rheum*; 46: 1986-96

Archer, C. W.; McDowell, J.; Bayliss, M.; Stephens, M. D.; Bentley, G. (1990): Phenotypic modulation in sub-populations of human articular chondrocytes in vitro, *J Cell Sci*; 97: 361-71

Aulthouse, A.L.; Beck, M.; Griffey, E.; Sanford, J.; Arden, K.; Machado, M., A.; Horton, W., A. (1998): Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro, *In Vitro Cell Dev Biol*; 25: 659-68

Aydelotte M.; B., Schumacher B. L.; Kuettner K., E. (1992): Heterogeneity of articular chondrocytes, In: Kuettner, K., E.; Schleyerbach, R.; Peyron, J., G.; Hascall, V., C. (Hrsg.): *Articular cartilage and osteoarthritis* New York: Raven Press; 237-249

Bae, S. C.; Yamaguchi-Iwai, Y.; Ogawa, E. et al. (1993): Isolation of *Pebp2aB* cDNA representing the mouse homolog of human acute myeloid leukemia gene *AML1*, *Oncogene*; 8: 809-814

Bahrami S.; Stratmann U.; Wiesmann H., P.; Mokrys K.; Bruckner P.; Szuwart T. (2000): Periosteally derived osteoblast-like cells differentiate into chondrocytes in suspension culture in agarose, *Anat Rec*; 259: 124-30

Battmann A.; Schaller M.; Fink L.; Rose J.; Bohle R., M.; Schulz A.; Stahl U. (2000): *Cbfa1* Expression is upregulated in Human Articular Chondrocytes in vitro: A Model for Regulation?, *J Bone Min Res; Suppl*; 1: Mo52

Battmann A.; Schaller M.; Fink L.; Rose J.; Bohle R., M.; Schulz A.; Stahl U. (2001): Regulation of *Cbfa1* Expression in Human Articular Chondrocytes in vitro in: *Osteologie*; Verlag Hans Huber Bern Göttingen Seattle Toronto; 10: 146

Battmann A.; Nusselt T.; Walz L.; Schaller M.; Hendrich C., H.; Fink L.; Haas H.; Jürgensen I.; Stahl U.: Cartilage Surgery and Future Perspectives, Chapter 13: 115-123 in: Chondrocytes aus Hendrich, C.; Nöth, U.; Eulert, J.; Springer Berlin, Heidelberg, New York 2003

Bej A., K.; Mahbubani M., H.; Atlas R., M. (1991): Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications, Crit Rev Biochem Mol Biol; 26: 301-334

Benninghoff, A. (1925): Form und Bau der Gelenkknorpel in ihrer Beziehung zur Funktion, Z Zellf; 2: 783-862

Bitounis B.; Solomon L. (1990): Bone death in osteoarthritis, J Bone Joint Surg; 72: 533

Buckwalter, J.A.; Goldberg, V.M.; Booth, F.; Eyre, D.R. (1993): Current Concepts Review, Soft-Tissue Aging and Musculoskeletal Function, J Bone Joint Surg; 75-A: 1533-1544

Bustin S., A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, J Mol Endoc; 25: 169-193

Caplan, A., I.; Pechak, D., G. (1987): The cellular and molecular embryology of bone formation, Bone and mineral research (ed. W. A. Peck); 117-183

Chubinskaya, S.; Huch, K.; Schulze, M.; Otten, L.; Aydelotte, M., B.; Cole, A., A. (2001): Gene expression by human articular chondrocytes cultured in alginate beads. J Histochem Cytochem; 49: 1211-20.

Crombrugge de, B.; Lefebvre, V.; Nakashima, K. (2001): Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation, Current Opinion in Cell Biology; 13: 721-727

Debrunner, A.M.: Eigenschaften des Gelenkknorpels in: Orthopädie, Orthopädische Chirurgie S. 83-85 aus Debrunner, A.M. , Verlag Hans Huber Bern 1994

Drenckhahn, D.: Allgemeine Gelenklehre, Arthrologie S. 215-228 in: Anatomie Bd. 1 aus Benninghoff, A., Urban & Schwarzenberg 1994

Ducy, P.; Zhang, R.; Geoffroy, V.; Ridall, A. L.; Karsenty, G. (1997): *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation, *Cell*; 89: 747-754

Erlenbacher, Q.; Filvaroff, E. H.; Gitelman, S. E.; Derynck, R. (1995): Toward a molecular understanding of skeletal development, *Cell*; 80: 371-378

Fassbender, H.G.; Anfeld, M.; Wilhelmi, G.; Maier, R. in: Gelenkknorpel und Arthrose aus: Documenta Geigy 1982

Ferguson, A., B. (1964): The pathological changes in degenerative arthritis of the hip and treatment by rotational osteotomy, *J Bone Joint Surg*; 46: 1337

Fink, L.; Kohlhoff, S.; Stein, M., M.; Hanze, J.; Weissmann, N.; Rose, F.; Akkayagil, E.; Manz, D.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Bohle, R., M.(2002): cDNA array hybridization after laser-assisted microdissection from nonneoplastic tissue, *Am J Pathol. Jan*; 160: 81-90

Gerber, H. P.; Vu, T. H.; Ryan, A. M.; Kowalski, J.; Werb, Z.; Ferrara, N. (1999): VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation, *Nature Medicine*; 5: 623-628

Gerstenfeld, L., C.; Cruceta, J.; Shea, C., M.; Sampath, K.; Barnes, G., L.; Einhorn, T., A. (2002): Chondrocytes provide morphogenic signals that selectively induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *J Bone Miner Res*; 17:221-30.

Gibson, U., E.; Heid, C., A.; Williams, P., M. (1996): A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Gen Res*; 6: 995-1001

Giulietti, A.; Overbergh, L.; Valckx, D.; Decallonne, B.; Bouillon, R.; Mathieu, C. (2001): An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression, *Methods*; 25: 386-401

Golub, T. R.; Barker, G. F.; Bohlander, S. K. et al. (1995): Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on the 21p22 in acute lymphoblastic leukemia, *Proc Natl Acad Sci USA*; 92: 4917-4921

Grelsamre, R., P. (1995): Unicompartemental osteoarthritis of the Knee, *J Bone Joint Surg*; 77: 278-292

Haudenschild, D.R.; McPherson, J., M.; Tubo, R.; Binette, F. (2001): Differential expression of multiple genes during articular chondrocyte redifferentiation, *Anat Rec*; 263: 91-8

Hauselmann, H., J.; Aydelotte, M., B.; Schumacher, B., L.; Kuettner, K., E.; Gitelis, S., H.; Thonar, E., J. (1992): Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads, *Matrix*; 12: 116-29

Hauselmann, H. J.; Fernandes, R., J.; Mork, S., S.; Schmid, T., M.; Block, J., A.; Aydelotte, M., B.; Kuettner, K., E.; Thonar, E., J. (1994): Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads, *J Cell Sci*; 107: 17-27

Hegert, C.; Kramer, J.; Hargus, G.; Muller, J.; Guan, K.; Wobus, A., Muller, P., K.; Rohwedel, J. (2002): Differentiation plasticity of chondrocytes derived from mouse embryonic stem cells, *J Cell Sci*; 115: 4617-28.

Heid, C., A.; Stevens, J.; Livak, K., J.; Williams, P., M. (1996): Real time quantitative PCR. *Gen. Res*; 6: 986-994

Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R (1993): Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions, *Biotechn*; 11: 1026-1030

Holland, P., M.; Abramson, R., D.; Watson, R.; Gelfand, H., D. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'->3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Proc Natl Acad Sci USA*; 88: 7276-7280

Hoshi, K.; Komori, T.; Ozawa, H. (1999): Morphological characterization of skeletal cells in *Cbfa1*-deficient mice, *Bone*; 25: 639-651

Inada, M.; Yasui, T.; Nomura, S.; Miyake, S.; Deguchi, K.; Himeno, M.; Sato, M.; Yamagiwa, H.; Rimura, T.; Yasui, N.; Ochi, T.; Endo, N.; Kitamura, Y.; Kishimoto, T.; Komori, T. (1999): Maturational disturbance of chondrocytes in *Cbfa1*-deficient mice, *Dev Dyn*; 214: 279-290

Iti, Y.; Bae, S., C. (1997): The runt domain transcription factor, *Pebp2/Cbf*, and its involvement in human leukaemia, *Progress in Gene Expression* (ed. M. Karin); 107-132

Ito, Y. (1996): Structural alterations in the transcription factor *Pebp2/Cbf* linked to four different types of leukaemia, *J. Cancer Res Clin Oncol*; 122: 266-274

Ito, Y. (1999): Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the runt domain transcription factor *Pebp2/Cbf*, *Genes to Cell*; 4: 685-696

Jee, W., S.: *Skeletal Tissues in: Cell and Tissue Biology* aus: Weiss L (editor), Urban und Schwarzenberg, Baltimore Munich 6.ed 1988

Jubel, A.; Andermahr, J.; Koebeke, J.; Hauselmann, H., J.; Rehm, K., E. (2002): Treatment of defects of joint cartilage, *Dtsch Med Wochenschr*; 127: 1904-8.

Junqueira, L., C.; Carneiro, J.: Knochen S. 190-217 in: Histologie aus: Junqueira, L., C.; Carneiro, J., Springer Verlag Berlin 1996

Junqueira, L., C.; Carneiro, J.: Knorpel S. 180-189 in: Histologie aus: Junqueira, L., C.; Carneiro, J., Springer Verlag Berlin 1996

Kanina, M., A.; Bonner, A., S.; Duffy, J., B.; Gergen, J., P. (1990): Genes Dev; 4: 1701-1713

Kim, I., S.; Otto, F.; Zabel, B.; Mundlos, S. (1999): Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1, Mech Dev; 80: 159-170

Komori, T.; Yagi, H.; Nomura, S.; Yamaguchi, A.; Sasaki, K.; Deguchi, K.; Shimizu, Y.; Bronson, R., T.; Gao, Y., H.; Inada, M.; Sato, M.; Okamoto, R.; Kitamura, Y.; Yoshiki, S.; Kishimoto, T. (1997): Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts, Cell; 89: 755-764

Komori, T.; Kishimoto, T. (1998): Curr Opin Genet Dev; 8: 494-499

Kurz, B.; Jin, M.; Patwari, P.; Cheng, D., M.; Lark, M., W.; Grodzinsky, A., J. (2001): Biosynthetic response and mechanical properties of articular cartilage after injurious compression, J Orthop Res; 19: 1140-6

Lee, B.; Thirunavukkarasu, K.; Zhou, L. et al. (1997): Missense mutation abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor Osf2/Cbfa1 in cleidocranial dysplasia, Nature Genet; 16: 307-310

Lee, D., A.; Salih, V.; Stockton, E., F.; Stanton, J., S.; Bentley, G. (1997): Effect of normal synovial fluid on the metabolism of articular chondrocytes in vitro, Clin Orthop; 342: 228-38

Levanon, D.; Negreanu, V.; Bernstein, Y. et al (1994): AML1, AML2 and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression and chromosomal localization, Genomics; 23: 425-432



Livak, J., K.; Schmittgen, T., D. (2001): Analysis of Relative Gene Expression Data using Real-Time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method, *Methods*, 25: 401-408

Löffler, G.: *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*; S. 333-365, 371-380, 663-673 aus: Löffler, G.; Springer Verlag Berlin 1999

Linsenmayer, T., F.; Chen, Q., A.; Gibney, E.; Gordon, M., K.; Marchant, J., K.; Mayne, R.; Schmid, T., R. (1991): Collagen types IX and X in the developing chick tibiotarsus: Analysis of mRNAs and proteins, *Development*; 111: 191-196

Maroudas, A.; Mizrahi, J.; Katz, E., P.; Wachtel, E., J.; Soudry, M.: *Physikochemical Properties and Functional Behavior of Normal and Osteoarthritic Human Cartilage in: Articular Cartilage Biochemistry* S. 311-329 aus: Kuettner, K.; Schleyerbach, R.; Hascall, V., Raven Press New York 1986

Martin, J., A.; Buckwalter, J., A. (2002): Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis, *Biogerontology*; 3: 257-64.

Mitani, K.; Ogawa, S.; Tanaka, T. et al. (1994): Generation of the AML1-EV1-1 fusion gene in the t(3;21) (q26;q22) causes blastic crisis in chronic myelocytic leucemia, *EMBO J*; 13: 504-510

Miyoshi, H.; Shimizu, K.; Koza, T. et al. (1991): t(8;21) breakpoints on chromosom 21 in acute myeloid leukaemia are clustered within a limited region of a single gene AML1, *Proc Natl Acad Sci USA*; 88: 10431-10434

Mohr W.: *Arthrotische Gelenkumgestaltung in: Gelenkpathologie*, Springer Verlag Berlin 2000

Mullis, K., B. (1990): Target amplification for DANN analysis by the polymerase chain reaction, *Ann Biol Clin (Paris)*; 48: 579-82

Mullis, K., B.; Ferré, F.; Gibbs, R., A. (1994): *The polymerase chain reaction* aus: Birkhäuser, Basel, Berlin, Boston 1994

Mundlos, S. (1994): Expression patterns of matrix genes during human skeletal development, *Prog Histochem Cytochem*; 28: 1-47

Mundlos, S.; Mulliken, J., B.; Abramson, D., L. et al. (1995): Genetic mapping of cleidocranial dysplasia and evidence of a microdeletion in one family, *Hum Mol Genet*; 4: 71-75

Mundlos, S.; Huang, L., F.; Selny, P.; Olsen, B., R. (1996): Cleidocranial dysplasia in mice, *Ann N. Y. Acad Sci*; 785: 301-302

Mundlos, S.; Otto, F.; Mundlos, C.; Mulliken, J., B.; Aylsworth, A., S.; Albright, S.; Lindhout, D.; Cole, W., G.; Henn, W.; Knoll, J., H.; Owen, M., J.; Mertelsmann, R.; Zabel, B., U.; Olsen, B., R. (1997): Mutations involving the transcription factor Cbfa1 cause cleidocranial dysplasia, *Cell*; 89: 773-779

Niethard, F., U.; Pfeil, J.: Gelenkerkrankungen in: MLP Duale Reihe Orthopädie S. 181-186 aus: Niethard, F., U.; Pfeil, J., Hippokrates Verlag, Stuttgart 1997

Nucifora, G.; Begy, C., R.; Erickson, P.; Drabkin, H., A.; Rowley, J., D. (1993): The 3;21 translocation in myelodysplasia results in fusion transcript between AML1 gene and the gene for EAP, a highly conserved protein associated with the Epstein-Barr virus small RNA EBER1, *Proc Natl Acad Sci USA*; 90: 7784-7788

Ogawa, E.; Maruyama, M.; Kagoshima, H.; Inuzuka, M.; Lu, J.; Satake, M.; Shigesada, K.; Ito, T. (1993): *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6859-6863

Okuada, T.; van Deursen, J.; Hiebert, S., W.; Grodsveld, G.; Downing, J., R. (1996): AML1, the target of multiple chromosomal translocation in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis, *Cell*; 84: 321-330

Orlando, C.; Pinzani, P.; Pazzagli, M.(1998): Developments in quantitative PCR, *Clin Chem Lab Med*; 36: 255-269

Otto, F.; Thornell, A., P.; Crompton, T.; Denzel, A.; Gilmour, K., C.; Rosewell, I., R., Stamp, G., W., H.; Beddington, R., S., P.; Mundlos, S.; Olsen, B., R.; Selby, P., B.; Owen, M., J. (1997): *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development, *Cell*; 89: 765-771

Overbergh, L.; Giulietti, A.; Valckx, D.; Decallonne, R.; Bouillon, R.; Mathieu, C.(2003): The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression, *J Biomol Tech*; 14: 33-43

Peterson, L.; Minas, T.; Brittberg, M.; Nilsson, A.; Sjogren-Jansson, E.; Lindahl, A. (2000): wo- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee, *Clin Orthop*; 374: 212-34

Peterson, L.: Autologous Chondrocyte Transplantation (ACT) – Long-Term Results, Chapter 3; pp.19-28 in: *Cartilage Surgery and Future Perspectives* aus: Hendrich, C.; Nöth, U.; Eulert, J., Springer Berlin, Heidelberg, New York 2003

Poole, C., A.: The Structure and Funktion of Articular Cartilage Matrices S. 1-35 in: *Joint Cartilage Degradation* aus: Woessner, J., F.; Howell, D., S., Marcel Dekker, Inc., New York 1993

Pschyrembel: *Arthrose* S. 142 in *Pschyrembel* 260. Aufl., de Gruyter Verlag Berlin 2004

Putz, R.: *Knorpelgewebe*, In: *Anatomie* Bd. 1 S. 160-165 aus Benninghoff, A., Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore 1994

Reiter, I.; Tzukerman, M.; Maor, G. (2002): Spontaneous differentiating primary chondrocytic tissue culture: a model for endochondral ossification, *Bone*; 31: 333-9

Rodan, G., A.; Harda, S. (1997): The missing bone, *Cell*; 89: 677-680

Roth, V.; Mow, V., C. (1980): The Intrinsic Tensile Behavior of the Matrix of Bovine Articular Cartilage and Its Variation with Age, *J Bone Joint Surg*; 62: 1102-1115

Rudert, M.: Chondrocytes and polymer Fleeces, Chapter 16; pp.141-150 in: Cartilage Surgery and Future Perspectives aus: Hendrich, C.; Nöth, U.; Eulert, J., Springer Berlin, Heidelberg, New York 2003

Schneider, U.; Gavénis, K.: Chondrocytes and collagen Gels, Chapter 18; pp.157-164 in: Cartilage Surgery and Future Perspectives aus: Hendrich, C.; Nöth, U.; Eulert, J., Springer Berlin, Heidelberg, New York 2003

Schulze, M.; Kuettner, K., E.; Cole, A., A. (2000): Adult human chondrocytes in alginate culture. Preservation of the phenotype for further use in transplantation models, Orthopäde; 29: 100-6

Shi, M., J.; Stavenzer, J. (1998): Cbfa3 (AML2) is induced by TGF- $\beta$  to bind and activate the mouse germline Ig $\alpha$  promotor, J Immunol; 161: 6751-6760

Sokoloff, L. (1980): The pathology of osteoarthritis and the role of aging. The aetiopathogenesis of osteoarthritis, Nuki G. Pitman Medical Publishing Co Ltd, Turnbridge Wells, Kent. Pp 1-15

Stricker, S.; Fundele, R.; Vortkamp, A.; Mundlos, S. (2002): Role of Runx genes in chondrocyte differentiation, Dev Bio; 245: 95-108

Takeda, S.; Bonnamy, J., P.; Owen, M., J.; Ducky, P.; Karsenty, G. (2000): Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice, Genes and Development; 15: 467-481

Tew, S.; Redman, S.; Kwan, A.; Walker, E.; Khan, I.; Dowthwaite, G.; Thomson, B.; Archer, C., W. (2001): Differences in repair responses between immature and mature cartilage, Clin Orthop; 391: 142-52

Tillmann, B.: Knorpelgewebe, Hyaliner Knorpel, in: Anatomie des Menschen I, Bewegungsapparat S. 34-37 aus: Tillmann, B.; Töndury, G.; Ziller, K., Georg Thieme Verlag Stuttgart 1998

von der Mark, K.; Conrad G. (1979): Cartilage cell differentiation: review, Clin Orthop; 139: 185-205

Vu, T., H.; Shipley, J., M.; Bergers, G.; Berger, J., E.; Helms, J., A.; Hanahan, D.; Shapiro, S., D.; Senior R., M.; Werb, Z. (1998): MMP-9 gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes, Cell; 93: 411-422

Wang, Q.; Stacy, T.; Bindr, M. et al. (1996): Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis, Proc Natl Acad Sci USA; 93: 3444-3449

Wedge, J., H.; Wasylenko, M., J.; Houston, C., S. (1991): Minor anatomic abnormalities of the hip joint persisting from childhood and their possible relationship to idiopathic osteoarthritis, Clin Orthop; 264: 122-8

Weiss, C.; Rosenberg, L.; Helfet, A., J. (1968): An Ultrastructural Study of Normal Young Adult Human Articular Cartilage, J Bone Joint Surg; 50-A: 663-674

Werner, A.; Arnold, J.: Transplantation of osteochondral autografts, Chapter 7; pp.57-66 in: Cartilage Surgery and Future Perspectives aus: Hendrich, C.; Nöth, U.; Eulert, J., Springer Berlin, Heidelberg, New York 2003

Wilhelm, J.; Pingoud, A. (2003): Real-Time Polymerase Chain Reaction, Chem Bio Chem; 4: 1120-1128

Zhang, Y., W.; Bae, S., C.; Takahashi, E.; Ito, Y. (1997): The cDNA cloning of the transcripts of human Pebp2 $\alpha$ A/Cbfa1 mapped to 6p12.3-p21.1, the locus for cleidocranial dysplasia, Oncogene; 15: 367-371

## **8      Veröffentlichungen**

### **Vorträge**

Battmann, A.; Nusselt, T.; Walz, L.; Schaller, M.; Hendrich, C.; Fink, L.; Haas, H.; Jürgensen, I.; Stahl, U.: Chondrozyten, Osteoblast 2002, Würzburg: 29-30 November 2002

Nusselt, T.; Walz, L.; Fink, L.; Stahl, U.; Haas, H.; Fölsch, C.; Schulz, A.; Battmann, A.: Regulation der Cbfa1 Expression in gesunden und arthrotischen humanen Gelenkchondrozyten, Osteologie 2003, Göttingen: 26-29 März 2003

Walz, L.; Nusselt, T.; Fink, L.; Stahl, U.; Bohle, R., M.; Schulz, A.; Battmann, A.: TGF- $\beta$ 1 - verhindert die Dedifferenzierung von Chondrozyten in vitro - ein sinnvoller Cofaktor für das Tissue Engineering?, Osteologie 2004, Leipzig: 3-7 März 2004

### **Buchbeiträge**

Battmann A.; Nusselt T.; Walz L.; Schaller M.; Hendrich C., H.; Fink L.; Haas H.; Jürgensen I.; Stahl U.: Cartilage Surgery and Future Perspectives, Chapter 13: 115-123 in: Chondrocytes aus Hendrich, C.; Nöth, U.; Eulert, J.; Springer Berlin, Heidelberg, New York 2003

### **Poster**

Nusselt, T.; Walz, L.; Fink, L.; Bohle, R., M.; Schulz, A.; Stahl, U.; Battmann, A. (2002): Regulation der Cbfa1 Expression in humanen Gelenkchondrozyten in vitro, 2. Bad Sassendorfer Knorpelsymposium 6-7.9.2002, 1. Posterpreis

Walz, L.; Nusselt, T.; Fink, L.; Stahl, U.; Wilhelm, J.; Bohle, R., M.; Schulz, A.; Battmann, A. (2004): TGF- $\beta$ 1 prevents dedifferentiation of alginate embedded chondrocytes in vitro. Strategies in Tissue Engineering. 15-19 Juni 2004 Würzburg.

## 9 Anhang

### 9.1 statistische Daten

#### Einfaktoriell: Passage 0 – gesund

##### Deskriptive Statistik

Wert

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
d0	3	1,45200	1,73730	1,00303	-2,86370	5,76770	,435	3,458
d14	3	,68000	,65475	,37802	-,94649	2,30649	,100	1,390
d28	3	,78467	,26763	,15452	,11984	1,44949	,476	,952
Gesamt	9	,97222	1,00557	,33519	,19927	1,74517	,100	3,458

##### ANOVA

Wert

				Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	(Kombiniert)			1,052	2	,526	,449	,658
	Linearer	Kontrast		,668	1	,668	,570	,479
	Term	Abweichung		,384	1	,384	,328	,588
Innerhalb der Gruppen				7,037	6	1,173		
Gesamt				8,089	8			

#### Post-Hoc-Tests

##### Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Wert

LSD

(I) Zeitpunkt	(J) Zeitpunkt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
d0	d14	,77200	,88425	,416	-1,39168	2,93568
	d28	,66733	,88425	,479	-1,49635	2,83102
d14	d0	-,77200	,88425	,416	-2,93568	1,39168
	d28	-,10467	,88425	,910	-2,26835	2,05902
d28	d0	-,66733	,88425	,479	-2,83102	1,49635
	d14	,10467	,88425	,910	-2,05902	2,26835

## Einfaktoriell: Passage 1 – gesund

### Deskriptive Statistik

Wert

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
d0	2	5,64500	5,47018	3,86800	-43,50260	54,79260	1,777	9,513
d14	2	1,31900	1,2728E-02	9,00E-03	1,20464	1,43336	1,310	1,328
d28	2	2,32100	,66185	,46800	-3,62550	8,26750	1,853	2,789
Gesamt	6	3,09500	3,18975	1,30221	-,25244	6,44244	1,310	9,513

### ANOVA

Wert

				Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	(Kombiniert)			20,512	2	10,256	1,013	,461
	Linearer Term	Kontrast		11,049	1	11,049	1,092	,373
		Abweichung		9,463	1	9,463	,935	,405
Innerhalb der Gruppen				30,361	3	10,120		
Gesamt				50,873	5			

## Post-Hoc-Tests

### Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Wert

LSD

(I) Zeitpunkt	(J) Zeitpunkt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
d0	d14	4,32600	3,18125	,267	-5,79816	14,45016
	d28	3,32400	3,18125	,373	-6,80016	13,44816
d14	d0	-4,32600	3,18125	,267	-14,45016	5,79816
	d28	-1,00200	3,18125	,773	-11,12616	9,12216
d28	d0	-3,32400	3,18125	,373	-13,44816	6,80016
	d14	1,00200	3,18125	,773	-9,12216	11,12616



## Einfaktoriell: Passage 2 – gesund

### Deskriptive Statistik

Wert

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
d0	3	1,96833	1,95440	1,12837	-2,88667	6,82334	,435	4,169
d14	3	2,88233	2,55652	1,47601	-3,46842	9,23308	,217	5,314
d28	3	,93367	,64702	,37356	-,67361	2,54094	,360	1,635
Gesamt	9	1,92811	1,84565	,61522	,50942	3,34681	,217	5,314

### ANOVA

Wert

				Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	(Kombiniert)			5,703	2	2,852	,794	,494
	Linearer Term	Kontrast		1,606	1	1,606	,447	,529
		Abweichung		4,097	1	4,097	1,141	,327
Innerhalb der Gruppen				21,548	6	3,591		
Gesamt				27,251	8			

## Post-Hoc-Tests

### Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Wert

LSD

(I) Zeitpunkt	(J) Zeitpunkt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
d0	d14	-,91400	1,54734	,576	-4,70020	2,87220
	d28	1,03467	1,54734	,529	-2,75153	4,82086
d14	d0	,91400	1,54734	,576	-2,87220	4,70020
	d28	1,94867	1,54734	,255	-1,83753	5,73486
d28	d0	-1,03467	1,54734	,529	-4,82086	2,75153
	d14	-1,94867	1,54734	,255	-5,73486	1,83753

## Einfaktoriell: Passage 0 – arthrotisch

### Deskriptive Statistik

Wert

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
d0	2	,26350	,1920E-02	1,55E-02	5,6554E-02	,46045	,248	,279
d14	2	,47700	,10889	7,70E-02	-,50138	1,45538	,400	,554
d28	2	2,17500	,28709	,20300	-,40436	4,75436	1,972	2,378
Gesamt	6	,97183	,94691	,38657	2,1885E-02	1,96555	,248	2,378

### ANOVA

Wert

				Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	(Kombiniert)			4,388	2	2,194	69,469	,003
	Linearer Kontrast			3,654	1	3,654	115,681	,002
	Term Abweichung			,735	1	,735	23,257	,017
Innerhalb der Gruppen				,476E-02	3	3,159E-02		
Gesamt				4,483	5			

## Post-Hoc-Tests

### Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Wert

LSD

(I) Zeitpunkt	(J) Zeitpunkt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
d0	d14	-,21350	,17772	,316	-,77909	,35209
	d28	-1,91150*	,17772	,002	-2,47709	-1,34591
d14	d0	,21350	,17772	,316	-,35209	,77909
	d28	-1,69800*	,17772	,002	-2,26359	-1,13241
d28	d0	1,91150*	,17772	,002	1,34591	2,47709
	d14	1,69800*	,17772	,002	1,13241	2,26359

\*. Die mittlere Differenz ist auf der Stufe .05 signifikant.

## Einfaktoriell: Passage 1 – arthrotisch

### Deskriptive Statistik

Wert

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
d0	4	5,59650	3,63870	1,81935	-,19349	11,38649	,510	9,063
d14	4	4,57350	4,72364	2,36182	-2,94286	12,08986	1,790	11,631
d28	4	11,44150	6,21416	3,10708	1,55338	21,32962	4,198	18,507
Gesamt	12	7,20383	5,49666	1,58675	3,71142	10,69625	,510	18,507

### ANOVA

Wert

				Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	(Kombiniert)			109,840	2	54,920	2,221	,164
	Linearer Kontrast			68,328	1	68,328	2,764	,131
	Terminale Abweichung			41,512	1	41,512	1,679	,227
Innerhalb der Gruppen				222,506	9	24,723		
Gesamt				332,346	11			

## Post-Hoc-Tests

### Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Wert

LSD

(I) Zeitpunkt	(J) Zeitpunkt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
d0	d14	1,02300	3,51589	,778	-6,93049	8,97649
	d28	-5,84500	3,51589	,131	-13,79849	2,10849
d14	d0	-1,02300	3,51589	,778	-8,97649	6,93049
	d28	-6,86800	3,51589	,083	-14,82149	1,08549
d28	d0	5,84500	3,51589	,131	-2,10849	13,79849
	d14	6,86800	3,51589	,083	-1,08549	14,82149

## Einfaktoriell: Passage 2 – arthrotisch

### Deskriptive Statistik

Wert

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
d0	5	2,90380	1,45552	,65093	1,09653	4,71107	1,125	4,407
d14	5	5,19500	3,53376	1,58034	,80726	9,58274	,607	9,986
d28	5	2,95700	1,55056	,69343	1,03173	4,88227	1,580	5,351
Gesamt	15	3,68527	2,46609	,63674	2,31959	5,05094	,607	9,986

### ANOVA

Wert

			Quadrats umme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	(Kombiniert)		17,102	2	8,551	1,508	,260
	Linearer Kontrast		,076E-03	1	7,076E-03	,001	,972
	Term Abweichung		17,095	1	17,095	3,015	,108
Innerhalb der Gruppen			68,041	12	5,670		
Gesamt			85,143	14			

## Post-Hoc-Tests

### Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Wert

LSD

(I) Zeitpunkt	(J) Zeitpunkt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
d0	d14	-2,29120	1,50600	,154	-5,57249	,99009
	d28	-5,32000E-02	1,50600	,972	-3,33449	3,22809
d14	d0	2,29120	1,50600	,154	-,99009	5,57249
	d28	2,23800	1,50600	,163	-1,04329	5,51929
d28	d0	5,32000E-02	1,50600	,972	-3,22809	3,33449
	d14	-2,23800	1,50600	,163	-5,51929	1,04329

## Einfaktoriell: Analyse p0 d0/d14 gesund – arthrotisch

### ANOVA

WERT

			Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	(Kombiniert)		6449,927	1	16449,927	7,099	,076
	Linearer Term	Ungewichtet	6449,927	1	16449,927	7,099	,076
		Gewichtet	6449,927	1	16449,927	7,099	,076
Innerhalb der Gruppen			6951,390	3	2317,130		
Gesamt			13401,317	4			

## Einfaktoriell: Analyse p0 d0/d28 gesund – arthrotisch

### ANOVA

WERT

			Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	(Kombiniert)		602492,5	1	602492,54	95,128	,002
	Linearer Term	Ungewichtet	602492,5	1	602492,54	95,128	,002
		Gewichtet	602492,5	1	602492,54	95,128	,002
Innerhalb der Gruppen			9000,457	3	6333,486		
Gesamt			621493,0	4			

### Einfaktoriell: Analyse p1 d0/d14 gesund – arthrotisch

#### ANOVA

WERT

		Quadrats umme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	(Kombiniert)	0039,134	1	0039,134	,812	,418
	Linearer Ungewichtet	0039,134	1	0039,134	,812	,418
	Term Gewichtet	0039,134	1	0039,134	,812	,418
Innerhalb der Gruppen		8701,875	4	2175,469		
Gesamt		118741,0	5			

### Einfaktoriell: Analyse p1 d0/d28 gesund – arthrotisch

#### ANOVA

WERT

		Quadrats umme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	(Kombiniert)	114468,1	1	114468,07	1,470	,292
	Linearer Ungewichtet	114468,1	1	114468,07	1,470	,292
	Term Gewichtet	114468,1	1	114468,07	1,470	,292
Innerhalb der Gruppen		311426,9	4	77856,737		
Gesamt		425895,0	5			

## Einfaktoriell: Analyse p2 d0/d14 gesund – arthrotisch

### ANOVA

WERT

			Quadrats umme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	(Kombiniert)		2690,844	1	2690,844	,055	,822
	Linearer	Ungewichtet	2690,844	1	2690,844	,055	,822
	Term	Gewichtet	2690,844	1	2690,844	,055	,822
Innerhalb der Gruppen			292907,2	6	48817,864		
Gesamt			295598,0	7			

## Einfaktoriell: Analyse p2 d0/d28 gesund – arthrotisch

### ANOVA

WERT

			Quadrats umme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	(Kombiniert)		1958,576	1	1958,576	,402	,549
	Linearer	Ungewichtet	1958,576	1	1958,576	,402	,549
	Term	Gewichtet	1958,576	1	1958,576	,402	,549
Innerhalb der Gruppen			29199,062	6	4866,510		
Gesamt			31157,638	7			

## 9.2 Material und Reagenzien

Material	Hersteller
$\beta$ -Mercaptoethanol	(Sigma)
0,5ml DNA Hüttchen	(Eppendorf)
1,5ml Collecting Tubes	(QiaagenRNeasy <sup>®</sup> Protect Mini Kit)
1,5ml Reaktionsgefäß	(Eppendorf)
1,8ml Kryörhrchen	(Nunc)
10*PCR Puffer - II	(GeneAmp <sup>®</sup> Applied Biosystems)
10*PCR Puffer mit MgCl <sub>2</sub>	(GeneAmp <sup>®</sup> Applied Biosystems)
2ml Collecting Tubes	(QiaagenRNeasy <sup>®</sup> Protect Mini Kit)
2ml Reaktionsgefäß	(Eppendorf)
5ml Glaspipetten	(Hirschmann)
10ml Glaspipetten	(Hirschmann)
10ml Spritzen	(Braun)
10ml Zentrifugenröhrchen	(Greiner)
20ml Glaspipetten	(Hirschmann)
25ml Erlenmeyerkolben	(Greiner)
50ml Zentrifugenröhrchen	(Greiner)
24 Loch Platten	(Nunc)
70%iges Ethanol	(Riedel de Haën)
96%-100%iges Ethanol	(Riedel de Haën)
Agarose	(MBI Fermentas)
Alginat - Lösung	
Alginic Acid	(Sigma)
Ampli - Taq - Gold	(GeneAmp <sup>®</sup> Applied Biosystems)
Aqua ad injectabilia	(Braun)
Auflösepuffer	
CaCl <sub>2</sub> - Lösung	
CaCl <sub>2</sub> M 110, 99	(Merck)
Cellulose-Acetat Filter 0,2 $\mu$ m	(Sartorius)
Collagenase Type XI	(Sigma)
Deoxyribonuclease	(Sigma)



---

DMEM/Ham's F12K	(Biochrom AG)
DMSO - Dimethylsulfoxid	(Merck)
Dnase I stock solution	(Qiagen)
dNTP	(Eurobio)
EDTA Ethylendinitrilotetraessigsäure M372,24	(entrpr. TRIPLEX®     Merck)
Ethanol 70%	(Riedel de Haën)
Ethanol 96%-100%	(Riedel de Haën)
Ethidiumbromid	
Fetal Bovine Serum	(Sigma)
Gelkammer	(Bächler Tech)
Glasfaser Vorfilter	(Sartorius)
Handschuhe	(Kimberly-Clark)
Hank's	(Biochrom AG)
Hinf I - Markers	(Promega)
Isotone Kochsalzlösung	(Baxter)
Kanülen Durchmesser: 20G*1½", 0,9*40	(Terumo)
Kanülen Durchmesser: 24G*1", 0,55*25	(Terumo)
Kühl-Tischzentrifuge 5417 R	(Eppendorf)
Kühlzentrifuge Rotanta/TRC	(Hettich)
Kulturflaschen	(BD Falcon)
Ladepuffer	
MgCl <sub>2</sub>	(Roche)
Minisart Sterilfilter 0,2 µm	(Sartorius)
Multipipette	(Eppendorf)
Multipipettenspitzen 12,5ml	(Brand)
Na-Citrat M 294,1	(Merck)
NaCl M 58,44	(Carl Roth GmbH+Co)
Natronlauge	(Merck)
PCR - Cycler	(Tuchdown (ThermoHybaid))
Penicillin/Streptomycin	(Biochrom AG)
Petrischalen (Glas) - Durchmesser: 8,5cm	
Pinzetten steril	(Angiokard)
Pipet-Boy	(Integra Bioscience)
Pipette 1000µl	(Eppendorf)

Pipette 100µl	(Eppendorf)
Pipette 10µ	(Eppendorf)
Pipettenspitzen 1000µl	(Eppendorf)
Pipettenspitzen 100µl	(Eppendorf)
Pipettenspitzen 10µl	(Eppendorf)
Primer cbfa1 FW	(MWG Biotech AG)
Primer cbfa1 RV	(MWG Biotech AG)
Primer HPRT FP	(MWG Biotech AG)
Primer HPRT RP	(MWG Biotech AG)
Random Hexamers	(GeneAmp®Applied Biosystems)
RDD Buffer	(QiaqenRNeasy® Protect Mini Kit)
Reverse Transkriptase	(GeneAmp®Applied Biosystems)
RLT-Lysepuffer	(QiaqenRNeasy® Protect Mini Kit)
Rnase free water	(QiaqenRNeasy® Protect Mini Kit)
RNase Inhibitor	(GeneAmp®Applied Biosystems)
RNeasy Mini Column	(QiaqenRNeasy® Protect Mini Kit)
RPE Buffer	(QiaqenRNeasy® Protect Mini Kit)
RW1 - Buffer	(QiaqenRNeasy® Protect Mini Kit)
Skalpelle steril	(Feather)
Sterilfilter Porengröße: 0,20µm	(Sartorius)
TBS - Puffer	
Thermocycler	(TRIO-Thermoblock (Biometra))
Tischzentrifuge Biofuge A	(Heraeus)
Transforming Growth Factor beta 1	(Sigma)
Trypsin	(Gibco)
Vortexer: Minishaker MS 1	(Roth)
Wasserbad	(Memmert)

### 9.3 Abkürzungsverzeichnis

ACT	autologe Chondrozytentransplantation
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Cbf	Core binding factor
CCD	cleidocraniale Dysplasie
cDNA	complementary DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
d.h.	das heißt
DMEM	Dubecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
engl.	englisch
entspr.	entspricht
FAM	6-Carboxy-Fluoreszein
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl- Transferase
IE	internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
L	Liter
m	männlich
max.	maximal
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Min.	Minute

min	minimal
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NTP	Nukleosidtriphosphat
OCT	osteochondrale Knorpeltransplantation
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PebP	Polyomavirus enhancer binding protein
qrt-PCR	quantitative real time PCR
rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
sek.	Sekunden
TAMRA	6-Carboxy-tertramethyl-rodamin
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TGF	Transforming growth factor
vgl.	vergleiche
w	weiblich
z.B.	zum Beispiel

**andere Zeichen:**

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
nm	Nanometer
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
°C	Grad Celsius
U/min	Umdrehungen pro Minute

## **9.4 Ehrenerklärung**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

## 9.5 Danksagungen

Ich möchte Herrn Prof. Dr. A. Schulz, Direktor des Instituts für Pathologie der JLU - Gießen, für die Möglichkeit danken, diese experimentelle Untersuchung im Institut für Pathologie durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. A. Battmann, Leiter des Zellkultur Labors, für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Übertragung des Themas und Unterstützung bei schwierigen Fragen und Problemen im wissenschaftlichen Bereich.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Dr. U. Stahl, der mir stets mit kompetentem Rat in Belangen der Methodik und Literatursuche zur Seite stand.

Für die praktische und technische Unterstützung in allen Fragen der Ausführung und moralische Aufbauarbeit möchte ich bei Frau M. Roß (MTA-Zellkulturlabor) bedanken.

Danken möchte ich auch meinen Doktoranden Kollegen. Hier besonders Herrn L. Walz und Herrn F. Wagener.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn PD Dr. L. Fink, Frau M. Stein und Herrn Dr. J. Wilhelm aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R. M. Bohle für deren Kooperation.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern sowie Ärztinnen und Ärzten, des Instituts für Pathologie und der Orthopädischen Klinik danken, die durch ihre Unterstützung der Studie zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben.

Ganz herzlich möchte ich auch meinen Eltern und meiner Freundin Kristina danken, die mich mit aller Kraft unterstützt haben. Sie hatten stets ein offenes Ohr und haben mir in jeder Situation den Rücken gestärkt.

## 9.6 Lebenslauf

### Persönliche Angaben:

Name: Nusselt, Thomas

Anschrift: Rilkestr. 1  
35578 Wetzlar

Eltern: Vater: Dr. med. Steffen Nusselt  
Mutter: Cordula Nusselt, geb. Müller

Geburtsdatum: 27.01.1976

Geburtsort: Pirmasens/RhPf

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung:

1982-1986 Grundschule in Alzey (St. Marien Grundschule)

1986-1996 Gymnasium in Alzey (Gymn. am Römerkastell)  
(Abitur)

1996-1997 Zivildienst im DRK-Krankenhaus Alzey

### Studium:

1997-1998 Biologiestudium in Kaiserslautern (zwei Semester)

1998-2004 Studium der Humanmedizin an der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

16.04.2004 zweites Staatsexamen

26.04.2004 - 15.08.2004 erstes PJ Tertial im Fach Innere Medizin (Asklepios  
Klinik Lich - Lehrkrankenhaus der JLU Gießen)

16.08.2004 - 05.12.2004 zweites PJ Tertial im Fach Chirurgie (University of  
Stellenbosch/South Africa)

---

06.12.2004 - 26.03.2005	drittes Tertial im Fach Anästhesie (Asklepios Klinik Lich - Lehrkrankenhaus der JLU Gießen)
06.05.2005	drittes Staatsexamen

### **Berufliche Tätigkeiten:**

17.05.2005 - heute	Assistenzarzt im Klinikum Wetzlar (Lahn-Dill- Kliniken GmbH), Abteilung für Unfallchirurgie und Orthopädie
--------------------	--

### **Praxisbezogene Tätigkeiten:**

1998 - 1999	Altenpflegehelfer im Altenzentrum „Im Sohl“ in Ingelheim/Rhein
1999 - 2000	Stationsaushilfe im DRK-Krankenhaus Alzey
10/2000 - 3/2001	Praktikumsassistent im Institut für Physiologie/Gießen
2001 - 2005	wissenschaftl. Hilfsarbeiten im Institut für Pathologie/Gießen

### **Famulaturen:**

12.03.2001 - 12.04.2001	Allgemein- und Unfallchirurgie (DRK-KKH/Alzey)
16.02.2002 - 15.03.2002	Pathologie (Institut für Pathologie/Gießen)
29.07.2002-31.08.2002	Praxisfamulatur im Gebiet der Chirurgie (Praxis Dr. Michael Blazek/Wetzlar)
02.09.2002-02.10.2002	Innere Medizin (DRK-KKH/Alzey)

### **Doktorarbeit:**

Thema:	„Regulation der Cbfa1 Expression in humanen gesunden und arthrotischen Gelenkchondrozyten in vitro“ (Institut für Pathologie/Gießen)
--------	--